

Alternative Strategien gegen Malaria mit Hilfe transgener Pflanzen



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium*

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Henning Pennekamp

aus Kiel

1. Referent: Prof. Dr. Heribert Warzecha

2. Referent: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 21.10.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2015

Darmstadt 2015

D 17

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1. Malaria	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Morphologie der Plasmodien	4
1.1.3. Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	5
1.1.4. Pathogenese	8
1.1.5. Diagnostik, Behandlung und Impfstoffentwicklung	11
1.1.6. Maßnahmen zur Vektorkontrolle	14
1.2. RNA-Interferenz	16
1.2.1. Entdeckung der RNA-Interferenz	16
1.2.2. Funktionsweise der RNA-Interferenz	16
1.2.3. Anwendung von RNAi-Mechanismen in der grünen Biotechnologie	19
1.3. Nanobodies	22
1.3.1. Überblick über das Immunsystem	22
1.3.2. Antikörper und Schwerekettenantikörper	23
1.3.3. Eigenschaften von Nanobodies	24
1.4. Alternative Ansatzpunkte zur Reduktion der Malariaübertragung	27
1.4.1. Rolle der Speicheldrüsenproteine von Mücken für die Entwicklung der Plasmodien	27
1.4.2. Funktion von Faktor H für die Entwicklung der Plasmodien	28
1.5. Zielsetzung	31
2. Material und Methoden	34
2.1. Material	34
2.1.1. Laborgeräte	34
2.1.2. Chemikalien	35
2.1.3. Antibiotika	37
2.1.4. Puffer und Lösungen	38
2.1.5. Nährmedien	39
2.1.6. Kits	40
2.1.7. Enzyme und Proteine	40
2.1.8. Verbrauchsmaterialien	41
2.1.9. Primer	43
2.1.10. Bakterienstämme	44
2.1.11. Bakteriophagen	44
2.1.12. Plasmide	45
2.1.13. Antikörper	49
2.2. Methoden	50
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	50
2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50

2.2.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA-Fragmenten	51
2.2.1.3.	Denaturierendes Agarosegel zur Analyse von RNA	52
2.2.1.4.	Ligation und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	53
2.2.1.5.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	53
2.2.1.6.	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Bakterien	54
2.2.1.7.	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien per Hitzeschock	55
2.2.1.8.	Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Bakterien	55
2.2.1.9.	Herstellung kompetenter Agrobakterien	56
2.2.1.10.	Transformation kompetenter Agrobakterien per Hitzeschock	56
2.2.1.11.	Colony Screening	57
2.2.1.12.	DNA-Präparation	57
2.2.1.13.	DNA- und RNA-Quantifizierung	58
2.2.1.14.	DNase-Verdau zur Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen	58
2.2.1.15.	Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	59
2.2.1.16.	Restriktionsverdau	59
2.2.1.17.	Glycerolstocks	60
2.2.1.18.	Sequenzierung und Analyse von DNA-Sequenzen	60
2.2.1.19.	Quantitative Real-time-PCR (qPCR)	61
2.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	62
2.2.2.1.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
2.2.2.2.	Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	63
2.2.2.3.	Detektion von Proteinen mittels Western Blot	64
2.2.2.4.	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	65
2.2.2.5.	Produktion von rekombinanten Proteinen mittels IPTG-Induktion	66
2.2.2.6.	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen durch Affinitätschromatographie	66
2.2.2.7.	Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen	67
2.2.2.8.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	68
2.2.2.9.	Bio-Layer-Interferometrie	68
2.2.3.	Methoden zur Arbeit mit Pflanzen	70
2.2.3.1.	Stabile Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> ‘Petit Havana‘	70
2.2.3.2.	Transiente Produktion von rekombinanten Proteinen in <i>Nicotiana benthamiana</i>	71
2.2.3.3.	Oberflächensterilisation von Tabaksamen	74
2.2.3.4.	DNA-Extraktion aus Tabakpflanzen (CTAB-Methode)	75
2.2.3.5.	RNA-Extraktion aus Tabakpflanzen	75
2.2.3.6.	Protein-Extraktion aus Tabakpflanzen	76
2.2.3.7.	<i>In silico</i> Analyse der transgenen hpRNA mit Hilfe des Programms si-Fi	77
2.2.4.	Herstellung einer Phagen-Bibliothek	78
2.2.4.1.	Herstellung der cDNA-Bibliothek	78
2.2.4.2.	PCR-Amplifikation der VHH-Sequenzen	78
2.2.4.3.	Klonierung der VHH-Sequenzen in den Phagemid-Vektor pHEN4	80
2.2.4.4.	Transformation von elektrokompenten TG1-Zellen mit pHEN4	82
2.2.5.	Phagen-Display	83

2.2.5.1.	Herstellung von Nanobody-präsentierenden Phagen	85
2.2.5.2.	Panning	86
2.2.5.3.	Untersuchung von Einzelkolonien mittels PE-ELISA	87
2.2.6.	Methoden zur Arbeit mit <i>Anopheles stephensi</i>	89
2.2.6.1.	Zucht von <i>Anopheles stephensi</i>	89
2.2.6.2.	RNA-Extraktion aus <i>Anopheles stephensi</i> -Köpfen	90
2.2.6.3.	Transmission-Blocking-Assay	91
3.	Ergebnisse und Diskussion	92
3.1.	Teil 1: dsRNA-basierte Strategie gegen Malaria	93
3.1.1.	Generierung der Apyrase-cDNA aus <i>Anopheles stephensi</i>	93
3.1.2.	Klonierung von pAPY8141 zur Generierung spezifischer hpRNA mittels Tabakpflanzen	94
3.1.3.	<i>In silico</i> Analyse der hpRNA mit Hilfe des Programms si-Fi	100
3.1.4.	Stabile Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> ‚Petit Havana‘ mit pAPY7431#7	101
3.1.5.	Fütterungsversuch der weiblichen <i>Anopheles stephensi</i> -Mücken mit Saccharoselösungen	105
3.1.6.	Auswertung des Fütterungsexperiments zur Herunterregulierung der <i>apyrase</i> -Expression	106
3.2.	Teil 2: Nanobody-basierte Strategie gegen Malaria	115
3.2.1.	Ergebnisse zur Herstellung der Phagen-Bibliotheken	116
3.2.1.1.	PCR Amplifikation der VHH-Sequenzen	116
3.2.1.2.	Charakterisierung der hergestellten Phagen-Bibliotheken	119
3.2.2.	Identifikation und Produktion von Anti-Faktor H-Nanobodies	123
3.2.2.1.	Auswertung der Panningrunden	124
3.2.2.2.	Untersuchung der Reinheit von der Faktor H-Lösung mittels SDS-PAGE	125
3.2.2.3.	Screening von Nanobodies gegen Faktor H mittels PE-ELISA	127
3.2.2.4.	Klonierung der VHH-Sequenzen in den Expressionsvektor pHEN6(c)	133
3.2.2.5.	Produktion und Aufreinigung der Anti-Faktor H-Nanobodies	134
3.2.2.6.	Untersuchung der Bindungsaffinität der Nanobodies zu Faktor H mittels ELISA	139
3.2.3.	Charakterisierung von NbFH-2-17-1 mittels Bio-Layer-Interferometrie	140
3.2.4.	Ergebnisse des Transmission-Blocking-Assays	143
3.2.5.	Produktion des Fusionsproteins NbFH-2-17-1-Fc in <i>Nicotiana benthamiana</i>	149
4.	Zusammenfassung	160
5.	Summary	161
6.	Literaturverzeichnis	163
7.	Anhang	183
7.1.	Plasmidkarten	183
7.2.	Alignment und Klassifizierung der VHH-Aminosäuresequenzen	186
7.3.	Alignment der zur Klonierung verwendeten Apyrase-cDNA	188
7.4.	Rohdaten und Sequenzierungen	189
	Abkürzungsverzeichnis	190
	Abbildungsverzeichnis	192
	Tabellenverzeichnis	195

Danksagung	196
Lebenslauf	197
Ehrenwörtliche Erklärung	198

1. Einleitung

1.1. Malaria

1.1.1. Epidemiologie

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die von eukaryotischen Einzellern der Gattung *Plasmodium* ausgelöst und von weiblichen Stechmücken der Gattung *Anopheles* auf den Menschen übertragen wird. Malaria ist eine der schlimmsten parasitären Krankheiten der Menschheit und betrifft die meisten tropischen und subtropischen Nationen (White *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). Im Jahr 2014 waren 3.3 Milliarden Bürger in 97 Staaten einem stetigen Infektionsrisiko ausgesetzt. Davon lebten ca. 1.2 Milliarden Menschen in Gebieten mit einem hohen Erkrankungsrisiko und einer Malariainzidenz von mehr als einer Erkrankung pro Jahr pro 1000 Einwohner. Im Jahr 2013 gab es weltweit ungefähr 198 Millionen Malariafälle mit 584000 Todesopfern. Dabei traten 90% der durch Malaria verursachten Todesfälle in Afrika auf (WHO, 2014). Hauptsächlich sind Kinder mit einem Lebensalter von unter fünf Jahren und schwangere Frauen von einem tödlichen Verlauf der Krankheit betroffen (Crompton *et al.*, 2014). Malaria kann durch fünf *Plasmodium*-Arten beim Menschen ausgelöst werden. Dabei sind Erkrankungen durch *Plasmodium falciparum* oder *Plasmodium vivax* am häufigsten, können aber auch durch *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und im Südosten von Asien durch *Plasmodium knowlesi* hervorgerufen werden. Fast alle Todesfälle werden auf Grund eines schweren Krankheitsverlaufs durch eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* hervorgerufen. Auch während einer Schwangerschaft kann es zu einer indirekten Mortalität durch Schwangerschaftsabbrüche und zu verzögertem Wachstum der Embryonen in der Gebärmutter kommen (White *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu anderen vektorabhängigen Parasiten weisen die unterschiedlichen Plasmodienarten einen begrenzten Wirtsbereich auf und infizieren typischerweise nur einige nah verwandte Vertebraten. Trotz fehlender Reservoirwirte und vieler langfristig angelegter Programme zur Kontrolle von Malaria sind die humanpathogenen Plasmodienarten extrem erfolgreich. Die weltweite Verbreitung der Parasiten kann hauptsächlich darauf zurückgeführt werden, dass Stechmücken der Familie *Culicidae* ubiquitär und in einer hohen Anzahl auf den meisten Teilen der Erde anzutreffen sind (Matuschewski, 2006). Ungefähr 60 *Anopheles*-Arten können Malaria übertragen und zeichnen sich durch ihre Langlebigkeit, die Widerstandsfähigkeit gegenüber Umweltveränderungen, die Populationsdichte im tropischen Klima, ihre Fortpflanzungsrate und die Bevorzugung von Menschen für Blutmahlzeiten aus (White *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014). Auf dem afrikanischen Kontinent

überträgt hauptsächlich die Mückenart *Anopheles gambiae* die Parasiten, während *Anopheles stephensi* den Hauptvektor auf dem indischen Subkontinent und im Nahen Osten darstellt und dort für die Mehrheit der Malariainfektionen in urbanen Gebieten verantwortlich ist (White *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014). In Abbildung 1.1 ist eine Übersicht über das weltweite Verbreitungsgebiet von Malaria dargestellt.

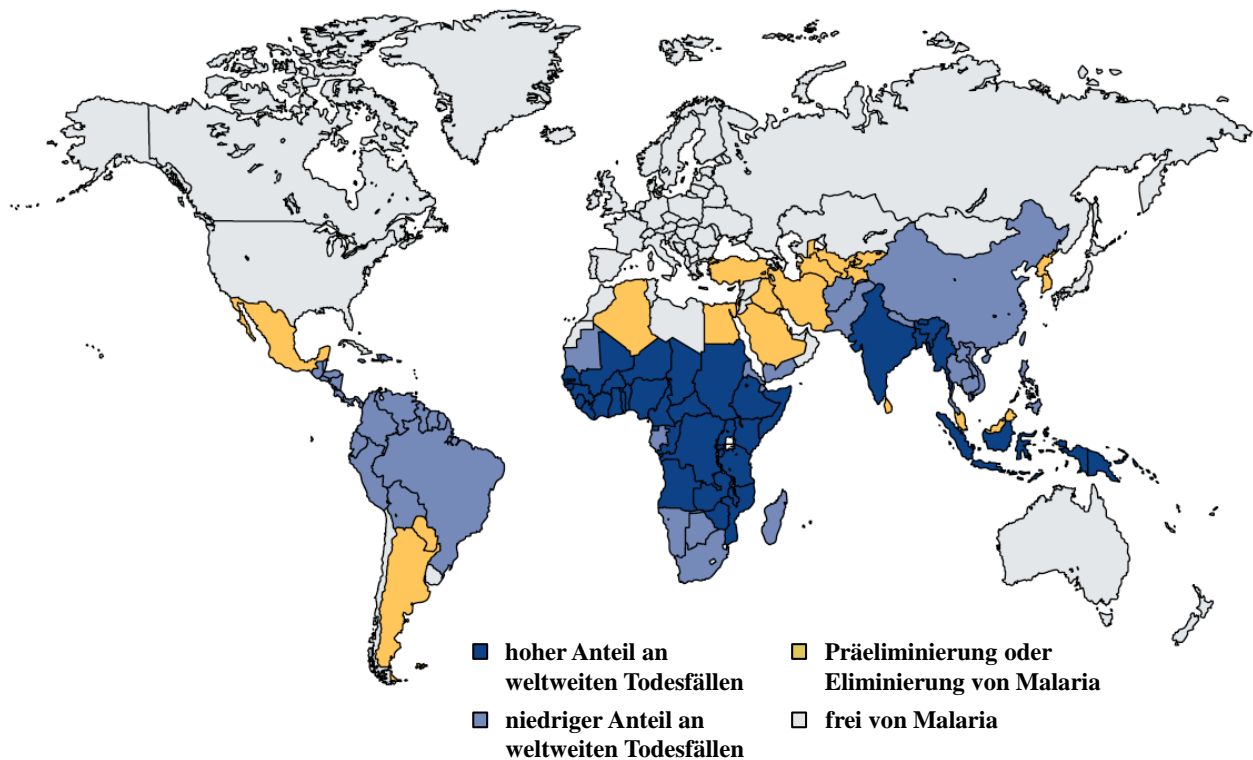


Abbildung 1.1 Verbreitungsgebiet von Malaria (verändert nach Alonso und Tanner, 2013). Die Karte zeigt zum einen die globale Verbreitung von Malaria und zum anderen den Anteil der einzelnen Staaten an den weltweiten Todesfällen. Des Weiteren sind einzelne Länder aufgezeigt, welche die Infektionskrankheit bereits eliminiert haben oder kurz davor stehen. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Alonso and Tanner, 2013), copyright (2013).

Stechmücken infizieren schon seit über 100000 Jahren Menschen mit *Plasmodium falciparum*, so dass sich die Parasiten und das humane Immunsystem durch Koevolution stetig aneinander anpassen. Auf Grund der hohen Mortalitätsrate durch eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* von Kindern und schwangeren Frauen wurde ein starker Selektionsdruck auf die Menschen in Risikogebieten ausgeübt, der zu einer enormen Anpassung des menschlichen Genoms führte (Crompton *et al.*, 2014). So ist die geographische Verteilung der Sichelzellenanämie ein Beispiel für den evolutiven Einfluss der Malariaerreger (White *et al.*, 2014). Bei der autosomal-rezessiv vererbten Krankheit besitzen betroffene Menschen mit einer heterozygoten Form eine erhöhte Resistenz gegenüber der schweren

Verlaufsform von Malaria, während homozygote Menschen an massiven gesundheitlichen Folgen, wie z.B. der hämolytischen Anämie, leiden. Durch die Bildung eines abnormen Hämoglobins verformen sich die roten Blutkörperchen unter Sauerstoffmangel oder durch eine Infektion mit Plasmodien sichelförmig und werden anschließend von Makrophagen eliminiert (Williams *et al.*, 2005), (Luzzatto, 2012). Des Weiteren können die Malariaerreger auf Grund eines veränderten Actingerüsts der Wirtszellen keine Proteine mehr zur Oberfläche der Erythrozyten zur Adhäsion an den Epithelwänden der Blutgefäße transportieren und werden daher in der Milz abgebaut (Cyrklaff *et al.*, 2011). Deswegen überschneidet sich die weltweite geographische Verbreitung von Malaria mit Gebieten, in denen die Sichelzellenanämie gehäuft auftritt. Dieser Zusammenhang wird besonders in Afrika südlich der Sahara deutlich (Piel *et al.*, 2010). Der starke Einfluss der Plasmodien auf die Immunmechanismen der Menschen und der *Anopheles*-Mücken geht wahrscheinlich mit einigen Vorteilen für die Wirte einher. So treten in endemischen Gebieten bestimmte Autoimmunkrankheiten kaum bei Menschen auf, da die Malariainfektionen Entzündungsreaktionen induzieren und die entzündungshemmende Antwort des Körpers möglicherweise die Entstehung der Krankheiten verhindert (Crompton *et al.*, 2014).

Zwischen 2000 und 2013 wurden durch eine Ausweitung der Malariainterventionen die weltweiten Neuerkrankungen um 30% reduziert. Im gleichen Zeitraum konnte die globale Sterberate um 47% verringert werden. Obwohl die afrikanische Bevölkerung in Malariagebieten um 43% zunahm, wurde die Anzahl von infizierten Menschen in Afrika um insgesamt 26% gesenkt (WHO, 2014). Trotzdem steht die weltweite Malariabekämpfung vor Problemen wie den zunehmenden Resistenzen der Plasmodien gegen Antimalariamedikamente und der Zunahme resistenter *Anopheles*-Mücken gegen Insektizide (WHO, 2014). Auch werden durch die Folgen der globalen Erwärmung mehr Menschen einem Malariarisiko ausgesetzt sein (Siraj *et al.*, 2014)

1.1.2. Morphologie der Plasmodien

Plasmodien sind einzellige, obligate Endoparasiten, gehören zum Phylum der Apicomplexa, welches mehrere tausend Arten umfasst, und durchlaufen einen Generationswechsel mit einer Schizogonie- und einer Sporogonie-Phase (Plattner und Soldati-Favre, 2008). Die invasiven und beweglichen Formen weisen eine verlängerte Form mit einem apikalen Komplex auf (Baum *et al.*, 2006). Plasmodien besitzen Apikoplasten, welche auf Grund eines sekundären, endosymbiontischen Ereignisses entstanden und daher mit vier Membranen ausgestattet sind. Der Apikoplast befindet sich in der Nähe des einzigen Mitochondriums und dient zur Lipidsynthese und zur Bildung einer parasitophoren Vakuole, die während der Interaktion zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle entsteht (Lim und McFadden, 2010). Des Weiteren besitzen Malariaerreger neben einem apikalen Polarring, der als Zentrum zur Organisation der Mikrotubuli dient, auch einzigartige sekretorische Vesikel in Form von Mikronemen und Rhoptrien. Mikroneme sind kleine Vesikel und befinden sich in der Nähe der paarig angeordneten Rhoptrien, die mit Proteinen und Phospholipiden gefüllt sind. Beide Organellen sekretieren ihre Inhalte an der anterioren Spitze des Parasiten und sind an seiner Fortbewegung beteiligt. Auch spielen sie eine wichtige Rolle während der Invasion der Wirtszellen und der Generierung der parasitophoren Vakuole, in der sich das Plasmodium innerhalb der Erythrozyten aufhält und repliziert (Kappe *et al.*, 2004). Unter der parasitären Plasmamembran befinden sich zwei weitere Membranen, die zusammen mit Filamenten aus Mikrotubuli eine Pellicula bilden. In dem inneren Membrankomplex befindet sich ein Aktin-Myosin-System, dass für die gleitende Fortbewegung der Plasmodien verantwortlich ist (Kappe *et al.*, 2004). Das Genom der Plasmodien besteht aus ungefähr 23-27 Millionen Basenpaaren, 14 Chromosomen und ca. 5500 Genen. Viele der Gene gehören zu Multigenfamilien, die wahrscheinlich für die Umgehung einer Immunantwort des Wirtes auf Grund einer Antigenvariabilität verantwortlich sind (Winzeler, 2008). Nach einem Zeitraum von sechs Jahren lag 2002 das komplette Genom von *Plasmodium falciparum* sequenziert vor (Gardner *et al.*, 2002), so dass die Suche nach neuen Wirkstoffen gegen Malaria maßgeblich vorangetrieben werden konnte. In Abbildung 1.2 ist der schematische, morphologische Aufbau eines Merozoiten von *Plasmodium falciparum* dargestellt.

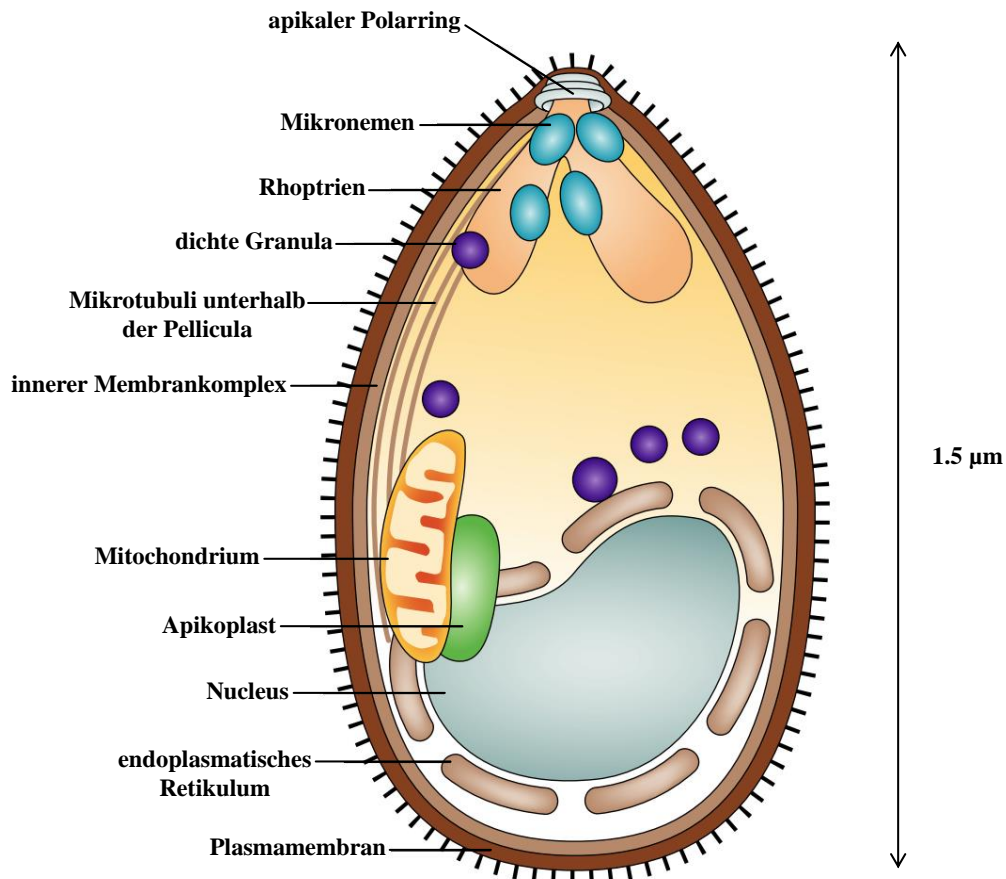


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des morphologischen Aufbaus von *Plasmodium falciparum* (Merozoit) (verändert nach Baum *et al.*, 2006). Der Merozoit ist nicht maßstabsgetreu abgebildet. Der innere Membrankomplex befindet sich zwischen der äußeren Membran und den darunterliegenden Mikrotubuli und besteht aus einem Netzwerk von membrangebundenen Zisternen, welche in dieser Abbildung nicht dargestellt sind. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Baum *et al.*, 2006), copyright (2006).

1.1.3. Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Die komplexe Entwicklung von *Plasmodium falciparum* ist in eine asexuelle Phase im menschlichen Zwischenwirt und in eine sexuelle Phase in einer weiblichen Mücke der Gattung *Anopheles* unterteilt. Der Lebenszyklus der Malariaerreger beginnt während einer Blutmahlzeit einer infizierten Mücke, bei der bewegliche Sporozoiten über den Speichel der Mücke in die menschliche Haut injiziert werden. Anschließend gelangen die Erreger über das Endothel in den Blutkreislauf und erreichen auf diesem Weg die Leber. Dort dringen die Sporozoiten in Kupffer-Zellen ein und infiltrieren anschließend

Hepatozyten. Innerhalb der Leberzellen können sich die Parasiten in einem Zeitraum von einer Woche um das 40000-fache vermehren und entwickeln sich zu Merozoiten, die über Vesikel in den Blutkreislauf entlassen werden. Anschließend dringen die asexuellen Formen in Erythrozyten ein und vermehren sich innerhalb von 48-stündigen Zyklen (Crompton *et al.*, 2014). Dabei dienen sowohl Proteine auf der Oberfläche der Merozoiten als auch Proteine der apikalen Organellen zur Erkennung und zur aktiven Invasion der roten Blutkörperchen (Florens *et al.*, 2002). Als Nächstes entwickeln sich die Parasiten innerhalb der Erythrozyten zu Trophozoiten, welche die Oberfläche der Wirtszellen verändern, Moleküle über die eigene Zellmembran transportieren und Hämoglobin als Proteinquelle benutzen (Florens *et al.*, 2002). Beim Abbau des Hämoglobins werden die zytotoxischen Hämgruppen in eine inerte, kristalline Form überführt, die Hämozoïn oder auch Malariapigment genannt wird (Sullivan, 2002). Eine Modifikation der Erythrozytenmembran erfolgt unter anderem durch die Expression eines *var*-Gens, von dem es ungefähr 60 Varianten gibt. Dadurch wird das *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) hergestellt, welches an eine Vielzahl von Liganden auf den Oberflächen der Endothelzellen binden kann. Der regelmäßige Wechsel des *var*-Gens zur Produktion von PfEMP1 resultiert in einer Antigenvariation, um so der adaptiven Reaktion des menschlichen Immunsystems zu entgehen (Flick und Chen, 2004). Durch die Adhäsion der infizierten, roten Blutkörperchen an den Blutgefäßen entgehen die Parasiten einem Abbau durch die Milz. Die Anlagerung in Geweben, wie dem Gehirn oder der Plazenta von schwangeren Frauen, ist mitverantwortlich für die schwere Verlaufsform der Malaria (Crompton *et al.*, 2014). In der nächsten Phase der Schizogonie teilen sich die Zellkerne der Trophozoiten, so dass die Erythrozyten nach der Bildung von 16-32 Merozoiten aufbrechen und weitere Infektionen von roten Blutkörperchen erfolgen können. Ungefähr zwei Wochen nach der Infektion befinden sich ca. 100 Millionen asexuelle Parasiten im menschlichen Blutkreislauf. Auf Grund des Befalls der Erythrozyten, deren Zerstörung und der anschließenden Reaktion des menschlichen Immunsystems werden die Symptome der Malariakrankheit ausgelöst (White *et al.*, 2014; Maier *et al.*, 2009). In Abbildung 1.3 ist eine schematische Übersicht über die erythrozytäre Entwicklung von *Plasmodium falciparum* dargestellt.

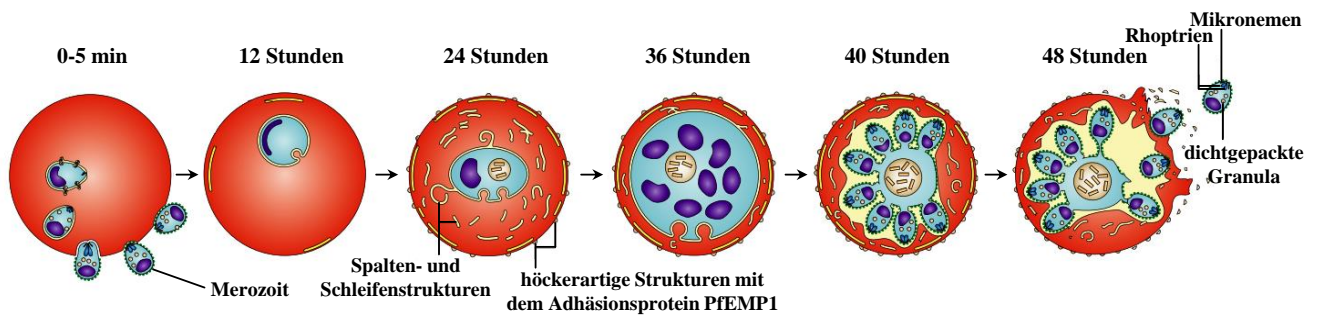


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Entwicklung von *Plasmodium falciparum* in menschlichen Erythrozyten (verändert nach Maier *et al.*, 2009). Die erythrozytäre Entwicklung beginnt mit der Invasion von roten Blutkörperchen durch Merozoiten. Die eingedrungenen Malariaerreger entwickeln sich in parasitären Vakuolen über eine Ringform (0-24 Stunden), einer Trophozoitform (24-16 Stunden) zu einer Schizontenform (40-48 Stunden). Nach 24 Stunden erscheinen membrangebundene Strukturen im Cytoplasma der roten Blutkörperchen und höckerartige Deformationen auf den Erythrozytenmembranen, so dass eine Adhäsion der Wirtszellen an die Oberfläche von Endothelzellen über das Protein PfEMP1 erfolgen kann. Nach ungefähr 48 Stunden reißen die roten Blutkörperchen auf und entlassen 16-32 Merozoiten in den menschlichen Blutkreislauf, die wiederum in andere Erythrozyten eindringen können. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Maier *et al.*, 2009), copyright (2009).

Die sexuelle Phase der Parasiten beginnt mit der Differenzierung einiger Plasmodien innerhalb der roten Blutkörperchen in weibliche Makro- und männliche Mikrogametozyten (White *et al.*, 2014). Nach der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles*-Mücke werden die aufgenommenen Gametozyten durch äußere Stimuli der Darmumgebung aktiviert, so dass sie die Erythrozyten verlassen und sich innerhalb von 20 Minuten zu fertilen Gameten entwickeln. Ungefähr eine Stunde nach der Blutmahlzeit findet die Befruchtung der Makrogameten statt und die entstandenen Zygoten entwickeln sich im Laufe eines Tages zu beweglichen Ookineten (Simon *et al.*, 2013). Diese durchdringen das Epithel des Mitteldarms und entwickeln sich unter der Basallamina zu sessilen Oozysten, um so einer Immunantwort der Mücke zu entgehen (Matuschewski, 2006). Die jungen Oozysten führen viele Kernteilungen durch und vergrößern gleichzeitig das Zellvolumen, so dass nach ein bis zwei Wochen tausende Sporozoiten in die Hämolymphe der Mücke entlassen werden (Matuschewski, 2006). Dort infiltrieren die Malariaerreger die Speicheldrüsen und können anschließend durch eine erneute Blutmahlzeit auf einen Menschen übertragen werden (Wang *et al.*, 2013). In Abbildung 1.4 ist der Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum* schematisch aufgeführt.

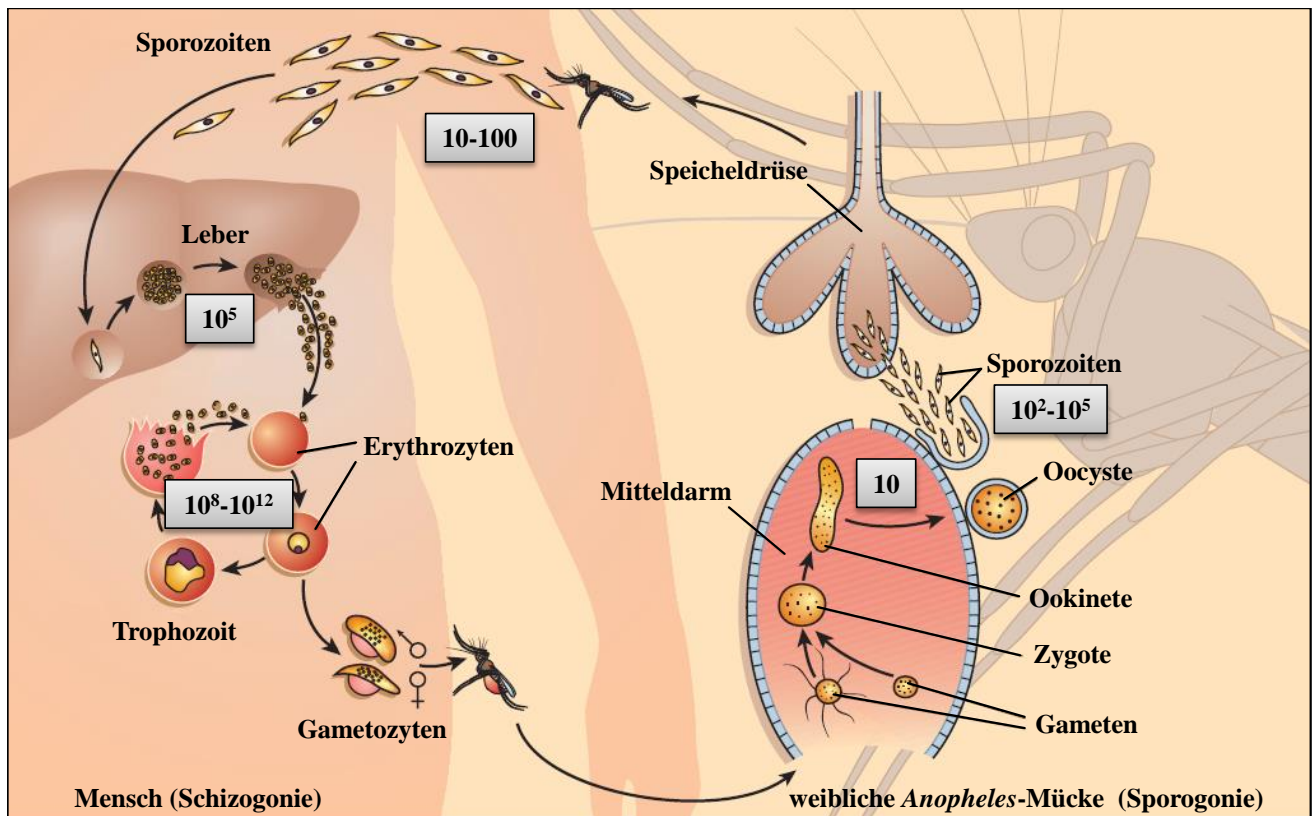


Abbildung 1.4 Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* (verändert nach Wirth, 2002; White *et al.*, 2014; Crompton *et al.*, 2014; Baton und Ranford-Cartwright, 2005). Der komplette Zyklus dauert ungefähr einen Monat. Die Anzahl der Parasiten während der unterschiedlichen Entwicklungsphasen ist in den entsprechenden Kästchen angegeben. Erklärungen zum Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* sind im Text aufgeführt. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Maier *et al.*, 2009), copyright (2009).

1.1.4. Pathogenese

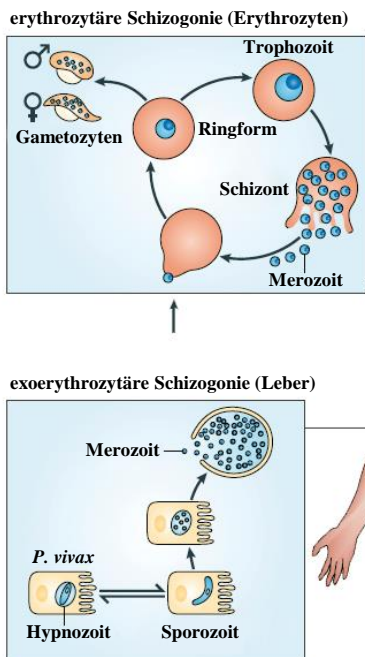
Malaria ist eine multifaktorielle Infektionskrankheit, so dass das Krankheitsbild durch die genetischen Variationen der Wirte und Parasiten, durch vorherige Infektionen, dem Alter, dem Ernährungszustand des Menschen und durch geographische und sozialwirtschaftliche Faktoren bestimmt wird (Gazzinelli *et al.*, 2014). Erste Symptome einer Malariaerkrankung sind die periodisch auftretenden Fieberschübe und Schüttelfröste. Diese erfolgen bei einer Infektion mit *Plasmodium vivax* oder *Plasmodium ovale* alle zwei Tage (Malaria tertiana) und bei einem Befall mit *Plasmodium malariae* alle drei Tage (Malaria quartana). Eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* führt zur schwersten Form unter den Malariaerkrankungen (Malaria tropica), bei deren Verlauf in unregelmäßigen Abständen Fieberschübe

und Schüttelfröste auftreten. Während einer Malaria tropica heften sich infizierte rote Blutkörperchen an die Oberflächen der Blutgefäße, so dass Mikrozirkulationsstörungen auftreten. Dadurch kann es zu einer verminderten Sauerstoffversorgung der betroffenen Organe kommen, welche zu einer zerebralen Malaria führen können. Die Periodizität der Fieberschübe wird auf Grund eines synchronisierten Verlassens der Merozoiten aus den Erythrozyten hervorgerufen, um sich so effizienter vor dem menschlichen Immunsystem zu schützen (Garcia *et al.*, 2001; Collins und Jeffery, 2005).

Plasmodium falciparum ist für zwei Drittel der weltweiten Malariainfektionen und für 90-95% der daraus resultierenden Todesfälle in Afrika verantwortlich. Die restlichen Malariafälle werden hauptsächlich durch *Plasmodium vivax* in sozial benachteiligten Gegenden in Lateinamerika und in Asien hervorgerufen. Die Infektionen nehmen jedoch meistens keinen tödlichen Verlauf, verursachen aber enorme ökonomische Kosten (Gazzinelli *et al.*, 2014). Bei nicht immunen Menschen treten 7-15 Tage nach der Infektion als erste unspezifischen Symptome Kopfschmerzen, ein Unwohlsein im Unterleibsbereich, Übelkeit, Brechreiz, Regulationsstörungen des Blutdrucks, Krämpfe und Muskelschmerzen gefolgt von den unregelmäßigen Fieberschüben auf. Die klinischen Malariasymptome erfolgen durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach dem Ausströmen der Merozoiten aus der Leber in den Blutkreislauf und lösen eine hohe Konzentration von zirkulierenden Cytokinen aus. (White *et al.*, 2014; Gazzinelli *et al.*, 2014; Crompton *et al.*, 2014).

Die meisten Patienten mit einer unkomplizierten Infektion zeigen Symptome wie Fieber, leichter Anämie und nach mehreren Tagen eine palpable Milz. Besonders bei Kindern kann sich die Leber vergrößern, während sich bei Erwachsenen eine leichte Gelbsucht entwickeln kann. Wenn die unkomplizierte Verlaufsform der durch *Plasmodium falciparum* ausgelösten Malaria unbehandelt bleibt, kann die Infektionskrankheit schnell einen schweren und tödlichen Verlauf nehmen (Gazzinelli *et al.*, 2014). Dabei hängen die klinischen Auswirkungen maßgeblich vom Lebensalter des Patienten ab. Bei erwachsenen Menschen treten häufig Lungenödeme, akutes Nierenversagen und Gelbsucht, bei Kindern vermehrt eine schwere Anämie und eine Hypoglykämie auf. Durch eine zerebrale Malaria verursachte Azidose oder ausgelöstes Koma sind hingegen unabhängig vom Alter mögliche Folgen der schweren Verlaufsform (White *et al.*, 2014). In Abbildung 1.5 ist eine schematische Übersicht über die Pathogenese und das Krankheitsbild einer Infektion durch *Plasmodium falciparum* aufgeführt.

A) Entwicklung von *Plasmodium falciparum*



B) Pathogenese von Malaria tropica

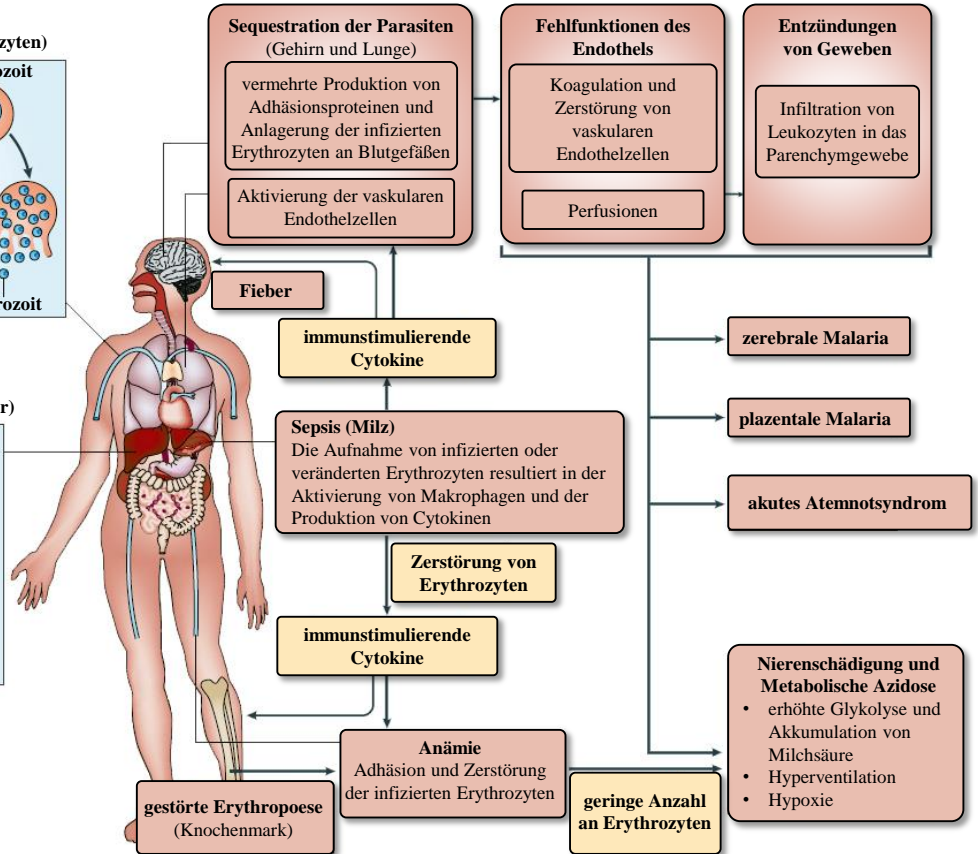


Abbildung 1.5 Schematische Übersicht über die Pathogenese und das Krankheitsbild einer Malaria tropica (verändert nach Gazzinelli *et al.*, 2014). A) Nach einer Blutmahlzeit einer infizierten, weiblichen *Anopheles*-Mücke wandern die Sporozoiten zur Leber und dringen in Hepatozyten ein. Dort entwickeln sich die Plasmodien zu Merozoiten, die in das Blut entlassen werden und dort Erythrozyten infizieren. Die sich wiederholenden Zyklen der Invasion, Replikation und Freisetzung von neuen Merozoiten führen zu einem exponentiellen Wachstum der Parasiten und schließlich zum Krankheitsbild der Malaria tropica. Bei einer Infektion der Hepatozyten durch *Plasmodium vivax* können sich Sporozoiten zu Hypnozoiten entwickeln, die für zeitlich verzögerte Ausbrüche der Malaria verantwortlich sein können. B) Die zirkulierenden Cytokine führen zu Krämpfen und induzieren die Produktion von Proteinen zur Adhäsion der infizierten roten Blutkörperchen an Oberflächen der Blutgefäße. Aufgrund der Anlagerung wird der Blutfluss gestört, die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Blutgerinnseln erhöht und Endothelzellen verletzt, so dass es zu lokalen Entzündungen der Gewebe kommen kann. Die Folgen können akute Atemnotsyndrome und zerebrale oder plazentare Malaria sein. Die aufgeführten Symptome treten in der Regel nicht bei Infektionen mit *Plasmodium vivax* auf. Auf Grund des Abbaus veränderter Erythrozyten durch Makrophagen in der Milz, der Hämolyse infizierter, roter Blutkörperchen und durch Störungen der Erythropoese durch Cytokine wird eine Anämie ausgelöst. Des Weiteren werden durch freies Hämoglobin oxidative Schäden und eine verminderte Sauerstoffversorgung der Gewebe verursacht. Eine metabolische Azidose wird durch veränderte Funktionen der Nieren induziert. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Maier *et al.*, 2009), copyright (2009).

Nach mehreren Malariainfektionen entwickeln die meisten Menschen in hyperendemischen Gebieten eine natürlich erworbene Immunität auf Grund eines hohen Titers an Antikörpern, die an zirkulierende

Merozoiten binden und die Invasion in die Erythrozyten blockieren. Zusätzlich werden die infizierten roten Blutkörperchen opsoniert, so dass die Plasmodien durch Makrophagen eliminiert werden. Während einer Infektion immuner Individuen erfolgt eine niedrige Parasitämie, so dass keine Aktivierung des angeborenen Immunsystems stattfindet und die Infektion in der Regel asymptomatisch verläuft (Gazzinelli *et al.*, 2014).

1.1.5. Diagnostik, Behandlung und Impfstoffentwicklung

Zur erfolgreichen Behandlung einer Malariaerkrankung ist die präzise Bestimmung der Plasmodienart entscheidend (Johnston *et al.*, 2006). Dennoch bleibt die auf der Symptomatik basierende klinische Diagnose die gebräuchlichste Methode, um Malaria zu diagnostizieren. Die geringe Genauigkeit dieses Verfahrens beruht auf dem extrem weiten Spektrum der Symptome. Deswegen werden zur genaueren Diagnostik Parasiten im Blut durch Mikroskopie, anhand immunologischer Schnelltests und mit Hilfe von PCRs nachgewiesen (Lee *et al.*, 2015). Der Goldstandard der unterschiedlichen Verfahren ist die mikroskopische Untersuchung eines Blutausstriches von einem Patienten und wird hauptsächlich in ländlichen Gebieten durchgeführt. Auf Grund der Giemsa-Färbung handelt es sich um eine günstige, schnelle und zur Quantifizierung geeignete Technik. Angesichts der morphologischen Unterschiede von infizierten Erythrozyten, Trophozoiten und Gametocyten können erfahrene Auswerter relativ genau die Plasmodienart bestimmen (Singh und Daneshvar, 2013; Johnston *et al.*, 2006). Immunologische Schnelltests wurden zur Detektion von Malaria und zur Untersuchung von Krankheitsausbrüchen in Gebieten ohne Zugang zu Elektrizität und für Labormitarbeiter, die in der mikroskopischen Auswertung von Blutausstrichen unerfahren sind, entwickelt. Diese Diagnoseform beinhaltet Antikörper, die entweder spezifisch an HRP-2 (*histidine-rich protein 2*) von *Plasmodium falciparum* oder an die Lactatdehydrogenase (LDH) von *Plasmodium falciparum* oder *Plasmodium vivax* binden. Normalerweise werden bei kommerziellen Schnelltests auch Pan-Malaria Antikörper verwendet, die eine spezifische Affinität zu einer Aldolase oder zu LDH der Plasmodien besitzen. Die immunologischen Nachweisverfahren wurden vor der Identifizierung von *Plasmodium knowlesi* als weiteren Auslöser der humanen Malaria entwickelt, so dass diese Plasmodienart auf diese Art und Weise nicht spezifisch nachgewiesen werden kann (Singh und Daneshvar, 2013). Die Schnelltests sind genauso effizient in der Diagnostik wie mikroskopische Routineuntersuchungen, haben jedoch einen höheren Preis und eignen sich nicht zur Quantifizierung der Parasitämie (White *et al.*, 2014). Ein Nachweis mittels PCR kann zur Spezifizierung der Plasmodienart nach einem erfolgten mikroskopischen Nachweis erfolgen. Daher wurden mehrere konventionelle PCR- und quantitative Real-time-PCR-Verfahren zur labordiagnostischen Bestimmung entwickelt (Johnston *et al.*, 2006).

Auf Grund der hohen Sensitivität eignet sich die Verwendung einer PCR auch als zusätzliche Diagnosetechnik bei einer geringen Parasitämie des infizierten Patienten (Coleman *et al.*, 2006), setzt aber das Vorhandensein eines entsprechend ausgestatteten Labors, geschultes Personal und im Verhältnis zur mikroskopischen Untersuchung kostspielige Reagenzien voraus (Johnston *et al.*, 2006).

Die Plasmodien können elf Tage nach der Infektion im Blut detektiert werden, so dass auch erst zu diesem Zeitpunkt die medikamentöse Therapie beginnen kann (Crompton *et al.*, 2014). Bis zum Ende der 1990er Jahre wurde die Behandlung eines unkomplizierten Malariaverlaufs, der von *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wurde, mit Chloroquin durchgeführt (Achan *et al.*, 2009). Der Wirkstoff inhibiert die Bildung von Hämozoin, so dass die Parasiten auf Grund der toxischen Wirkung des Häms absterben (Olafson *et al.*, 2015). Auf Grund einer weit verbreiteten Resistenzentwicklung empfiehlt die WHO jedoch die Verabreichung einer auf Artemisinin basierten Kombinationstherapie (*artemisinin-based combination therapy* (ACT)). Die Verwendung von zwei aktiven Wirkstoffen mit unterschiedlichen molekularen Mechanismen stellt zurzeit die effektivste medikamentöse Behandlungsmethode gegen Malaria dar. Zur Nutzung hat die WHO fünf verschiedene ACTs empfohlen, deren Wahl für den Patienten auf Grund von Wirksamkeitsstudien gegen die lokal auftretenden *Plasmodium falciparum*-Stämme getroffen wird. Auf die Durchführung von Monotherapien sollte jedoch grundsätzlich verzichtet werden, da so die Bildung von Resistenzen gefördert wird (WHO, 2014). Die auf Artemisinin basierten Kombinationstherapien bestehen jeweils aus einem schnell wirkenden Artemisinin-Derivat und einem weiteren, länger im Blut verbleibenden Medikament. Die Artemisinin-Komponente tötet Parasiten in der erythrozytären Phase inklusive der sexuellen Stadien schnell ab, so dass auch zusätzlich die Transmissionsrate verringert wird. Das zweite Medikament hat die Aufgabe die übrigen Plasmodien zu eliminieren und dadurch eine Resistenzentwicklung gegen Artemisinin zu verhindern. Auf Grund der längeren Halbwertszeit vermittelt das Partnermedikament auch eine prophylaktische Wirkung im Anschluss an die Behandlung (WHO, 2015). So wird auch die Wirkstoffkombination aus dem Artemisinin-Derivat Artemether und Lumefantrin zur effizienten Behandlung von Malaria eingesetzt. Artemisinin ist ein Sesquiterpen, stammt aus der Pflanze *Artemisia annua* und besitzt eine Peroxidbrücke, welche für die Wirkung gegen die Blutstadien der Plasmodien verantwortlich gemacht wird (Elfawal *et al.*, 2012; Shandilya *et al.*, 2013). Eine mögliche Erklärung für den Wirkungsmechanismus ist die Spaltung der Peroxidstruktur in der Gegenwart von Eisenionen des Häms zu hochreaktiven freien Radikalen. Diese modifizieren die Proteine der Plasmodien chemisch und führen so zum Tod des Parasiten. Zusätzlich scheint auch eine Interaktion mit der Kalziumpumpe PfATP6 zur Eliminierung der Malariaerreger beizutragen (Shandilya *et al.*, 2013). Der pharmakologische Ansatzpunkt von Lumefantrin liegt in der

Inhibierung der Kristallisation des für die Plasmodien toxischen Häms, so dass dadurch der Tod der Parasiten induziert wird (Byakika-Kibwika *et al.*, 2011). Die Sterblichkeitsrate einer unbehandelten schweren Verlaufsform von Malaria beträgt fast 100%, so dass eine schnelle und hochdosierte Behandlung essentiell für das Überleben des Patienten ist. Dazu erfolgt eine parentale medikamentöse Verabreichung von Artemisinin-Derivaten (WHO, 2015). Die Behandlung von Infektionen mit *Plasmodium vivax* erfolgt bei nicht resistenten Erregern mit Chloroquin, ansonsten wird auf Artemisinin basierte Kombinationstherapien zurückgegriffen (WHO, 2014). Eine Chemoprophylaxe wird generell bei Reisen in Gebiete mit einem potentiellen Malariarisiko empfohlen. Die einzunehmenden Medikamente variieren dabei in Abhängigkeit von der Wirksamkeit der Wirkstoffe gegen die lokal vorliegenden Plasmodien und von der Wahrscheinlichkeit dort mit Malaria infiziert zu werden. Als mögliche Medikamente kommen unter anderem Sulfadoxin-Pyrimethamin-Kombinationen, Chloroquin, Proguanil, Mefloquin und Doxycyclin in Frage. Die Chemoprophylaxe schließt jedoch nie einen Ausbruch der Infektionskrankheit aus. Daher sollte bei entsprechend auftretenden Symptomen eine Infektion mit Plasmodien nicht ausgeschlossen werden, selbst wenn sich der Patient nicht mehr in Gebieten mit einem Malariarisiko aufhält (White *et al.*, 2014). Eine detaillierte Darstellung zur medikamentösen Behandlung der unterschiedlichen Malariaformen ist in der Publikation „*Guidelines for the treatment of malaria*“ von der *World Health Organization* ausführlich beschrieben (WHO, 2015).

Da zurzeit kein zugelassener Impfstoff gegen Malaria existiert, steht die Wissenschaft vor der Aufgabe die Funktionen von über 5000 Proteinen von *Plasmodium falciparum* zu analysieren und Zielproteine für mögliche protektive Antikörper zu identifizieren. Die Schwierigkeit in der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes liegt zum Teil in der Diversität vieler Proteine der Malariaerreger und in der Fähigkeit der Parasiten, die zur Oberfläche der roten Blutkörperchen transportieren Proteine zu variieren. Deswegen können Individuen in endemischen Gebieten mit einem hohen Infektionsrisiko erst nach Jahren und mehreren Infektionen ein protektives Repertoire an Antikörpern ausbilden. Als bislang aussichtsreichster Impfstoff steht RTS,S (GlaxoSmithKline) kurz vor der Zulassung (Crompton *et al.*, 2014). In groß angelegten klinischen Studien wurden Kinder im Alter von 6-12 Wochen das erste Mal immunisiert und zeigten zwar eine gute Verträglichkeit aber auch nur einen Schutz von 30% gegenüber der klinischen Malaria und einen Schutz von 26% gegenüber der schweren Verlaufsform innerhalb von 12 Monaten nach der letzten Verabreichung des Impfstoffes. Bei einer Immunisierung von Kindern mit einem Alter von 5-17 Monaten wurden auf Grund eines Malariaschutzes von 55% und einer Prävention von 35% vor der schweren Verlaufsform bessere Ergebnisse erzielt (White *et al.*, 2014). Antikörper, die auf Grund der Immunisierung gebildet wurden,

binden an das *circumsporozoite proteins* (CSP) auf der Oberfläche der Sporozoiten und verhindern dadurch eine Invasion der Hepatozyten (Crompton *et al.*, 2014). Dadurch können die Parasiten nicht in das Blutstadium übergehen und die charakteristische Symptomatik der Malaria auslösen.

Der Zugang zu schnellen Diagnosetests und qualitativ hochwertigen Artemisinin-basierten Kombinationstherapien hat in den letzten Jahren weltweit zugenommen. So hat sich der Verkauf von Diagnosetests in endemischen Ländern im Zeitraum von 2008 bis 2013 um fast 700% erhöht. Des Weiteren wurden im Jahr 2013 392 Millionen Präparate für Artemisinin-basierte Kombinationstherapien verkauft, während im Jahr 2005 nur 11 Millionen umgesetzt wurden. Auch übertraf im Jahr 2013 zum ersten Mal die Anzahl der durchgeführten Diagnosetests in Afrika die Menge der durchgeführten Artemisinin-basierten Kombinationstherapien. Daher beruhen die Behandlungen immer weniger auf Vermutungen sondern auf klinisch nachgewiesenen Erregern (WHO, 2014).

In den letzten Jahren wurde eine aufkommende Artemisininresistenz der Plasmodien in Kambodscha, Laos, Myanmar, Thailand und in Vietnam festgestellt. Die Malariaerreger der Art *Plasmodium falciparum* sind in Gebieten an der Staatsgrenze von Kambodscha und Thailand resistent gegenüber den meisten erhältlichen Medikamenten gegen Malaria, so dass die zunehmende Resistenz zu einem immer größer werdenden Problem bei der Bekämpfung der Infektionskrankheit wird (WHO, 2014).

1.1.6. Maßnahmen zur Vektorkontrolle

Die Bekämpfung der *Anopheles*-Mücken ist eine wichtige Komponente der Malariaprävention (White *et al.*, 2014). Somit wurden in den letzten zehn Jahren Maßnahmen zur Vektorkontrolle in Afrika wesentlich erweitert, so dass im Jahr 2013 49% der in Risikogebieten lebenden Menschen Zugang zu Mückennetzen hatten, die mit Insektiziden behandelt worden waren. Im Jahr 2004 lag der Anteil der Bevölkerung mit einer solchen Malariaprävention bei nur 4%. Somit waren in Afrika im Jahr 2014 55 Millionen Einwohner in Risikogebieten mit entsprechenden Netzen versorgt. Zudem verwendeten 2013 weltweit 124 Millionen Menschen in ihren Wohnräumen regelmäßig sprühbare Insektenschutzmittel zur Mückenabwehr. Der örtliche Gebrauch hängt allerdings von der Neigung der jeweiligen *Anopheles*-Art ab, in das Haus einzudringen und sich auch dort aufzuhalten (WHO, 2014; White *et al.*, 2014). Bei der Verwendung von Pyrethroid-Insektiziden konnte die Mortalitätsrate bei Kindern mit einem Alter von unter 5 Jahren um ungefähr 20% reduziert werden (White *et al.*, 2014). Die insektizide Wirkung von Pyrethroiden beruht auf der Inaktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen und führt nach Kontakt mit den Insekten schnell zu deren Tod (Shafer *et al.*, 2005). In

Regionen mit hohem Infektionsrisiko ist eine Malariareduktion durch die Vektorkontrolle am effektivsten. Infolge der Verwendung von Insektiziden in der Landwirtschaft und bei imprägnierten Netzen wurden die *Anopheles*-Mücken jedoch einem massiven Selektionsdruck ausgesetzt, so dass in den Jahren 2010 bis 2013 in 53 Ländern Resistenzen der Insekten gegenüber mindestens einem Insektizid gemeldet wurden. Auch traten in 41 Staaten Resistenzen gegenüber zwei oder mehr Insektizidklassen auf. Dabei waren die Mücken am häufigsten gegen die oft eingesetzten Pyrethroide resistent (WHO, 2014; White *et al.*, 2014).

1.2. RNA-Interferenz

1.2.1. Entdeckung der RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um einen zellulären Prozess zur Genregulation durch doppelsträngige RNA (dsRNA), bei dem in eukaryotischen Zellen endogene mRNA-Stränge sequenzspezifisch degradiert werden, die Translation der Ziel-mRNA inhibiert oder die Transkription eines Gens durch Methylierung von genomischer DNA unterdrückt wird. Die Kontrolle der Genexpression findet mit Hilfe von 20 -30 Nukleotid langen, nicht codierenden RNA-Strängen und einer Gruppe von assoziierten Ribonukleoproteinen statt (Wilson und Doudna, 2013; Sarkies und Miska, 2014). Das Phänomen der RNAi wurde 1990 auf Grund eines ungewöhnlichen Expressionsmusters von transgenen Petunien entdeckt, bei denen eine Überproduktion der Chalkonsynthase durch den Einbau eines entsprechenden Gens erfolgen sollte. Die Chalkonsynthase fungiert als Schlüsselenzym in der Anthocyanin-Biosynthese und führt daher bei Petunien zu ihrer typisch violetten Blütenfarbe. Überraschenderweise bewirkte das eingebrachte Gen jedoch einen starken Rückgang der Pigmentierung, so dass eine Bildung von weißen Blüten erfolgte (Napoli *et al.*, 1990; Sen und Blau, 2006). Später stellte sich heraus, dass die transgene mRNA auf Grund von endogenen, komplementären Regionen eine partielle Duplexstruktur ausbildete (Agrawal *et al.*, 2003). Dieser Vorgang wurde Cosuppression genannt, da auf Grund der durch RNAi gebildeten, kleinen RNAs sowohl die transgene mRNA als auch die endogene mRNA abgebaut wurde (Sarkies und Miska, 2014). Nachfolgend wurden in kurzer Zeit weitere Beispiele der RNAi in vielen anderen Organismen entdeckt (McGinnis, 2010). Anhand von Experimenten mit Nematoden der Art *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass die Injektion von dsRNA im Vergleich zur Injektion von *sense* oder *antisense*-RNA zur effizienteren Translationsinhibierung der Ziel-mRNA führte. Damit wurde durch die Arbeit von Fire und Mello eine Grundlage zum Verständnis des Phänomens des *posttranscriptional gene silencings* (PTGS) gelegt (Fire *et al.*, 1998). Mittlerweile wurde die RNA-Interferenz als evolutionärer und konservierter Mechanismus identifiziert, der maßgeblich an der Entwicklung und Genregulation von eukaryotischen Lebewesen beteiligt ist (Cerutti und Casas-Mollano, 2006).

1.2.2. Funktionsweise der RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz erfolgt mit Hilfe von *short interfering RNAs* (siRNA), *microRNAs* (miRNA) oder *piwi-interacting RNAs* (piRNA) und leistet einen wichtigen Beitrag zur Regulation der

endogenen Genexpression oder zur zellulären Abwehr gegen invasive Nukleinsäuren. Die regulatorischen Effekte erfolgen durch die Bindung der kleinen RNAs an die Ziel-mRNA, so dass diese enzymatisch inaktiviert werden kann. Die siRNAs und miRNAs werden aus doppelsträngigen Präkursoren generiert, wohingegen die piRNAs nur in Tieren vorzufinden sind, eine maßgebliche Beteiligung in der Genregulation in der Keimbahn haben und aus einzelsträngigen Nukleinsäuren gebildet werden (Carthew und Sontheimer, 2009). Die miRNAs besitzen eine Länge von 20°-24 Nukleotiden, haben ihren zellulären Ursprung im Genom und werden durch Spaltung von Vorläufern gebildet, die eine Haarnadelstruktur aufweisen (Sarkies und Miska, 2014). Die siRNAs entstehen als Antwort auf eine virale Infektion, werden endogen mittels einer *antisense*-RNA generiert oder stammen aus einer exogenen Quelle (Wilson und Doudna, 2013; Sarkies und Miska, 2014). Sowohl miRNAs als auch siRNAs werden durch Dicer aus langer dsRNA generiert. Diese Proteine gehören zu einer Untergruppe der Ribonukleasen III-Enzyme und sind in allen eukaryotischen Lebewesen zu finden (Sarkies und Miska, 2014). Die Enzyme besitzen zwei RNase III-Domänen, eine N-terminale Helicase-Domäne und eine PAZ-Region, über welche die Bindung an das 5'-Ende der dsDNA erfolgt. Die Größe der produzierten siRNAs wird über den Abstand von der PAZ-Domäne zu den RNase III-Domänen bestimmt. Jede der RNase-Domänen spaltet jeweils einen RNA-Strang unter der Bildung eines 3'-Überhangs aus zwei Nukleotiden (Djupedal und Ekwall, 2009). Als Nächstes werden durch die Assoziation eines Argonautproteins (AGO) die einzelnen, geschnittenen Doppelstränge voneinander getrennt. Die Argonautproteine binden über eine PAZ-Domäne an das 3'- und über eine MID-Domäne an das 5'-Ende der doppelsträngigen siRNA und verhindern durch eine Spaltung der Ziel-mRNA mittels einer RNase H-Domäne die Translation. Die Trennung der Stränge erfolgt auf Grund der thermodynamischen Stabilität von den 5'-Enden der siRNAs. Dabei wird die Sequenz mit dem instabileren Ende als Leitstrang durch das Argonautprotein gebunden, während der komplementäre Teil degradiert wird (Djupedal und Ekwall, 2009). Der entstandene Ribonukleinproteinkomplex wird *RNA induced silencing complex* (RISC) genannt und induziert, abhängig von der Art der geladenen RNA, die Spaltung oder Degradation der Ziel-mRNA (Sarkies und Miska, 2014). Die gebundenen RNAs leiten den RISC zur Ziel-mRNA, bei der die miRNA über die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren an die 3'-untranslatierte Region bindet. Die Assoziation der RNA-Stränge erfolgt aber nur unvollständig, so dass die hohe Komplementarität der Seed-Region, die aus den Nukleotiden 2-8 besteht, essentiell für die stabile Bindung ist (Davidson und McCray, 2011). Dadurch wird die Translation inhibiert und die miRNA-RNA-Komplexe werden in cytoplasmatischen Prozessierungskörpern über einen Deadenylierungsschritt degradiert. Die siRNAs zeigen hingegen eine volle Komplementarität zur Ziel-mRNA, deren sequenzspezifische Spaltung durch das Argonautprotein 10-12 Basen strangabwärts vom 5'-Ende der Bindestelle des RISCs erfolgt.

Somit wird die Translation und Bildung des Proteins ebenfalls verhindert (Davidson und McCray, 2011). In Abbildung 1.6 ist der Mechanismus der RNA-Interferenz mittels miRNA und siRNA schematisch dargestellt.

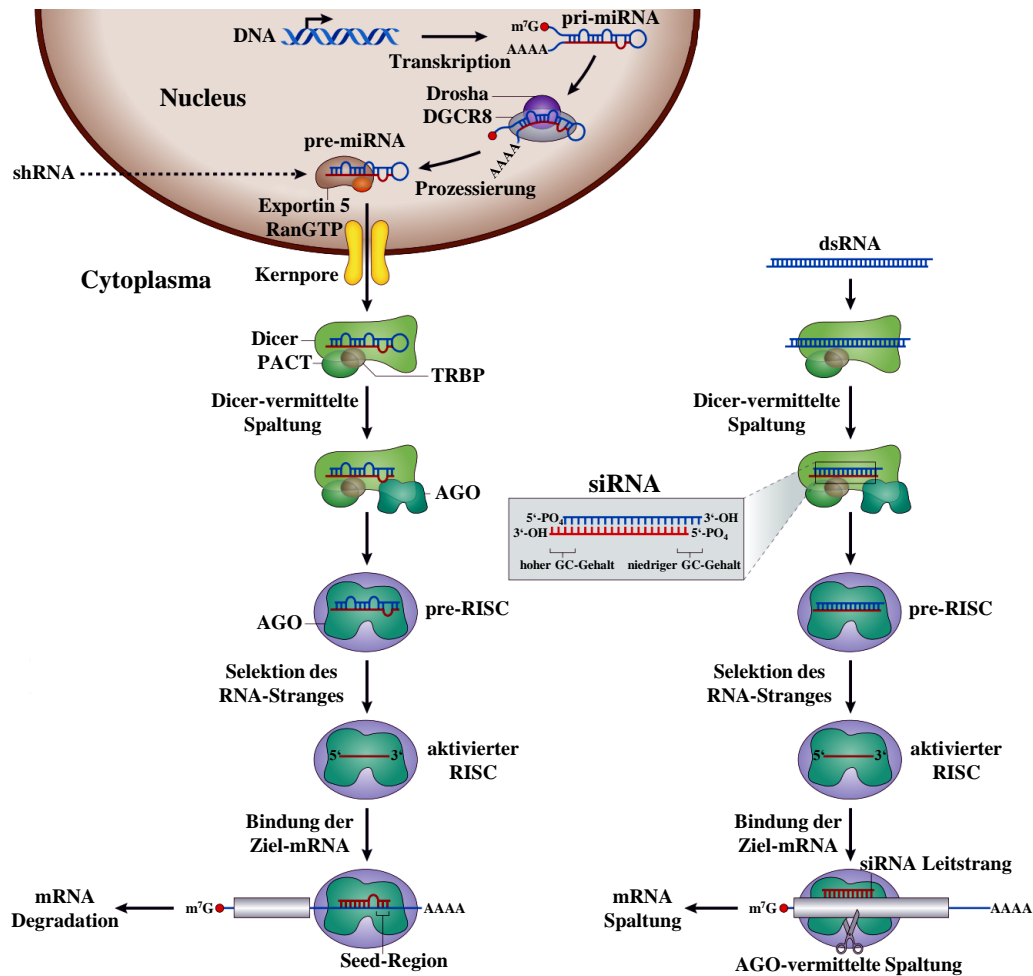


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des RNA-Silencings mittels miRNA und siRNA (verändert nach Davidson und McCray, 2011; Sarkies und Miska, 2014). Die primären miRNAs werden durch eine RNA-Polymerase transkribiert und mittels des Microprocessorkomplexes, der aus der RNase III Drosha und dem RNA bindenden Protein DGCR8 besteht, in ungefähr 70 Nukleotid lange pre-miRNAs prozessiert. Die pre-miRNAs besitzen eine Schleifenstruktur, die von fehlenden Basenpaarungen durchsetzt ist. Nach der Assoziation mit Exportin 5-Proteinen werden die pre-miRNAs in das Cytoplasma exportiert. Dort wird dann ein Komplex aus einem Dicer, einem TAR-RNA bindenden Protein (TRBP) und PACT gebildet, so dass die pre-miRNA in eine miRNA-miRNA-Duplexstruktur überführt wird. Durch die Assoziation mit einem Argonautprotein (AGO) wird daraufhin der pre-RNA *induced silencing complex* (RISC) gebildet. Der funktionelle RISC beinhaltet den Leitstrang zur Erkennung der Ziel-mRNA und zur Induzierung des *posttranscriptional gene silencings*. Die miRNA bindet typischerweise über die Seed-Region an den 3'-untranslatierten Bereich der mRNA. Lange dsRNA wird mittels Dicer, TRBP und PACT in 20-24 Nukleotid lange siRNAs prozessiert, die eine 3'-OH-, eine 5'-PO₄-Gruppe und einen 3'-Nukleotidüberhang aus zwei Nukleotiden besitzen. Der funktionelle RISC beinhaltet ein assoziiertes AGO-Protein und den Leitstrang, der an die Ziel-mRNA bindet und dadurch deren Spaltung initiiert. shRNA: *short hairpin RNA*. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Davidson and McCray, 2011), copyright (2011).

In Pflanzen können siRNAs in 21 und in 24 Nukleotid lange siRNA-Arten unterteilt werden, die verschiedenartig produziert werden und unterschiedliche Funktionen aufweisen. Die siRNAs mit einer Länge von 21 Nukleotiden werden durch das Dicer-Like 4-Enzym (DLC4) generiert, welches zur Familie der Ribonuklease III-Enzyme gehört und lange dsRNA zu kurzen, doppelsträngigen siRNAs schneidet. Anschließend binden die siRNAs an die Argonautproteine AGO1 und AGO2, welche die beiden Stränge voneinander trennen und die Bindung an die Ziel-mRNA initiieren. Die Herstellung der 24 Nukleotid langen siRNAs wird durch die Enzyme DCL3 und AGO4 initiiert (Sarkies und Miska, 2014). Auf Grund der siRNAs findet die Erkennung der Ziel-mRNA statt, so dass deren Degradation durch direkte Spaltung mittels der Endonukleaseaktivität der AGO-Proteine erfolgt. Im Fall der 24 Nukleotid langen siRNAs findet die transkriptionelle Inhibierung der Genexpression durch eine RNA-abhängige DNA-Methylierung der entsprechenden genomischen DNA statt. Die Methylierung wird während der Zellteilung übertragen und ermöglicht die epigenetische Vererbung der Gen-Stillegung. Beide kurze RNA-Arten werden entweder als Antwort auf exogene Auslöser, wie virale dsRNA, oder auf Grund endogener Transposon-Elemente hergestellt. Die pflanzlichen miRNAs werden mit Hilfe endogener Sequenzen generiert, die nach einer Transkription ungefähr 70 Nukleotid lange Haarnadelstrukturen ausbilden. Die gereiften miRNAs, die eine Länge von 20-23 Nukleotiden aufweisen, werden mittels des Dicer-Enzyms DCL1 gebildet und benötigen zur funktionellen Inhibierung der Translation die Bindung an AGO1 (Sarkies und Miska, 2014). Die 21 Nukleotid langen siRNAs werden also zur direkten Verteidigung von viraler RNA generiert, während 24 Nukleotid lange siRNAs als Antwort auf DNA-Viren verwendet werden. Auf Grund der DNA-Methylierung und der Rekrutierung von Faktoren, die das Chromatin in Heterochromatin umwandeln, werden die viralen Gene im pflanzlichen Genom deaktiviert (Sarkies und Miska, 2014; McGinnis, 2010). Kleine RNAs und deren Vorstufen können sich durch Plasmodesmen zwischen Zellen bewegen und besitzen damit eine potentielle Rolle in der systemischen, antiviralen Abwehr (Sarkies und Miska, 2014). Auch können 21 und 24°Nukleotid lange siRNA-Duplexstrukturen durch die Plasmodesmen geleitet und über lange Distanzen mit Hilfe des Phloems transportiert werden. Zur funktionellen Translationsinhibierung müssen in beiden verbundenen Zellen das Dicer-Enzym DICER-LIKE 4 (DCL4) und das Argonautprotein AGO2 vorhanden sein (Sarkies und Miska, 2014).

1.2.3. Anwendung von RNAi-Mechanismen in der grünen Biotechnologie

Mit Hilfe der RNA-Interferenz können die Funktionen von Genen in transgenen Pflanzen analysiert werden. Für eine posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression wird in das Genom der Pflanze ein Gen eingebracht, das eine invertierte codogene Sequenz des Ziel-Gens aufweist. Dadurch wird in

der Zelle dsRNA generiert, die zu siRNAs prozessiert wird und durch Bindung an die endogene Ziel-mRNA zur RNA-Interferenz führt. Um eine transkriptionelle Inhibierung zu erreichen, werden zur Generierung des transgenen Konstrukts Promoterregionen verwendet, die für die Expression des Ziel-Gens verantwortlich sind. Auf Grund der RNAi werden epigenetische Modifikationen initiiert, die schließlich in einer vererbaren Herunterregulation der Genexpression resultieren. Auf diese Weise war es möglich metabolisch modifizierte, transgene Pflanzen zu generieren, die verbesserte Eigenschaften in der Virusresistenz, im Ölgehalt oder in ihrer Vitalität aufwiesen (McGinnis, 2010).

Des Weiteren kann der RNAi-Mechanismus in transgenen Pflanzen auch als Schutzmaßnahme gegen Pflanzenschädlinge verwendet werden. Durch die Applikation von sequenzspezifischer dsRNA über die Nahrung ist es möglich, gegen ausgewählte Insektenarten vorzugehen und das Risiko von unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Organismen zu vermeiden (Huvenne und Smagghe, 2010). So konnten gezielt Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*), Mehlkäfer (*Tribolium castaneum*), Erbsenläuse (*Tribolium castaneum*) oder Larven der Tabakswürmer (*Manduca sexta*) durch die orale Verabreichung von artspezifischer dsRNA gegen V-ATPase-Transkripte getötet werden, ohne dass die entsprechenden dsRNAs Auswirkungen auf die anderen Arten gehabt hätten. Die V-ATPasen sind membrangebundene Proteine, die als Protonenpumpe fungieren und den pH-Wert im Darmlumen von vielen Insekten einstellen (Whyard *et al.*, 2009).

Der Mitteldarm von Insekten besteht aus nur einer Schicht von säulenförmigen Epithelzellen, weist auf Grund von Mikrovilli eine stark vergrößerte Oberfläche auf, besitzt viele Kanäle und Mechanismen zur Endozytose und eignet sich daher zur Aufnahme von dsRNA. Dieser Vorgang erfolgt wahrscheinlich über SID-ähnliche Proteine oder über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose (Huvenne und Smagghe, 2010). Damit die RNA-Interferenz durch exogene dsRNA in Insekten initiiert werden kann, muss nach der Nahrungsaufnahme der Transport der dsRNA aus dem Darmlumen in die Darmzellen erfolgen. Falls sich der Zielort der Genregulation in Geweben außerhalb des Darms befindet, muss sich das Signal zur Herunterregulierung der Genexpression systemisch durch die Zellen und das Gewebe verbreiten (Huvenne und Smagghe, 2010). Die systemische RNAi basiert in Pflanzen auf der Vervielfältigung der siRNAs durch RNA-abhängigen RNA-Polymerasen und deren Verbreitung durch Plasmodesmen. Entsprechende orthologe Mechanismen wurden zwar in Nematoden nachgewiesen, in Insekten scheint der RNA-Transport jedoch auf einem anderen Weg zu erfolgen (Huvenne und Smagghe, 2010).

Zum RNAi-basierten Schutz der Pflanzen vor Insekten werden essentielle Gene der Entwicklung, des Wachstums und des Metabolismus herunterreguliert (Kola *et al.*, 2015). Dabei sind Gene mit einer wichtigen Funktion im Mitteldarm der Insekten für eine effektive Unterdrückung der Expression prädestiniert (Kola *et al.*, 2015). Zum Einbau in das pflanzliche Genom kommen besonders Konstrukte

in Betracht, die nach der Transkription Haarnadelstrukturen ausbilden. Daher werden eine *sense*- und eine *antisense*-Sequenz der Ziel-mRNA und eine *spacer*-Sequenz zur Herstellung des Transgens verwendet (Younis *et al.*, 2014).

Durch die Fütterung von Larven der Baumwollmotte (*Helicoverpa armigera*) mit transgenem Blattmaterial aus Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana*, das ausreichende Mengen von dsRNA gegen die mRNA eines Cytochroms P450 auswies, wurde die Expression des *cyp6AE14*-Gens in den Insekten herunterreguliert. Die Schädlinge der Baumwollpflanzen benötigen das Cytochrom, um das toxische Sesquiterpen Gossypol in ihrem Darm abzubauen. Auf Grund der induzierten RNA-Interferenz wurde die Entwicklung der Larven stark beeinträchtigt, besonders wenn in ihrer Nahrungsquelle Gossypol vorhanden war (Mao *et al.*, 2007). Einige Jahre später wurden schließlich transgene Baumwollpflanzen (*Gossypium hirsutum* cv. R15) hergestellt, die durch die Bildung von CYP6AE14-dsRNA eine erhöhte Resistenz gegen Larven der Baumwollmotte aufwiesen (Mao *et al.*, 2011). Des Weiteren konnten Baum *et al.* transgene Maispflanzen generieren, die dsRNA mit einer V-ATPase-mRNA-Sequenz des westlichen Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera virgifera*) produzierten. Anschließend ernährten sich die Larven drei Wochen lang von den Wurzeln der transgenen Pflanzen. Eine anschließende Analyse der Fraßschäden zeigte, dass die genetisch veränderten Pflanzen deutlich weniger als die Kontrollpflanzen geschädigt worden waren (Baum *et al.*, 2007).

Die induzierte RNAi-Interferenz stellt damit eine aussichtsreiche Technologie zum Schutz von transgenen Pflanzen vor herbivoren Insekten dar (Zhang *et al.*, 2015). Auch scheint bei dieser Verfahrensweise kein Risiko der Akkumulation von dsRNA in der Umwelt zu bestehen, da eine schnelle Degradation der RNA durch ubiquitär verbreitete, bakterielle RNase III-Enzyme erfolgt (Coy *et al.*, 2012).

1.3. Nanobodies

1.3.1. Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem von Säugetieren besteht sowohl aus einer angeborenen als auch einer adaptiven Immunabwehr, die im Zusammenspiel den Organismus vor z.B. mikrobiellen Infektionen schützen (Medzhitov, 2007). Die angeborene Immunabwehr ist die initiale Antwort auf eingedrungene Pathogene oder Toxine und beinhaltet neben physikalischen Barrieren auch eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellen, Proteinen und kleinen Molekülen, die entweder konstitutiv oder durch Aktivierung produziert werden (Chaplin, 2010). Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort ist das Komplementsystem, welches aus einem regulierten Netzwerk von mehr als 30 Proteinen besteht und dessen Aktivierung in einer Kaskade von enzymatischen Reaktionen resultiert. Die ausgelöste Kaskade führt zur Opsonisierung, welche die Aufnahme von Erregern durch Fresszellen erleichtert, zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blutkapillare und zur Assemblierung von Membranangriffskomplexen, welche die Krankheitserreger lysieren (Sarma und Ward, 2011).

Die adaptive Immunabwehr basiert auf antigenspezifischen Reaktionen von T- und B-Lymphozyten und erfolgt mehrere Tage nach der Infektion des Organismus (Chaplin, 2010). Dabei können als Antigene sowohl kleine, chemische Strukturen als auch hochkomplexe Moleküle fungieren (Delves und Roitt, 2000). Zum einen werden Krankheitserreger auf Grund einer spezifischen Erkennung durch Phagozytose oder Apoptoseinduktion getötet (Delves und Roitt, 2000), zum anderen resultiert eine humorale Immunantwort in der Produktion von Antikörpern zum Schutz vor pathogenen Eindringlingen (Harwood und Batista, 2010). Eine weitere Besonderheit der adaptiven Immunabwehr sind Gedächtniszellen, die bei erneuten Infektionen und der Identifizierung von bekannten Antigenen zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort führen (Parkin und Cohen, 2001).

Die Entstehung von Antikörpern durch somatische Rekombination ermöglicht ein nahezu unbegrenztes Repertoire an Antikörperspezifitäten, so dass theoretisch jede chemische oder biologische Verbindung vom Immunsystem erkannt werden kann. Nach einer Immunisierung vermehren sich B-Zellen, die einen Antikörper gegen ein Epitop produzieren, millionenfach durch klonale Proliferation in peripheren lymphatischen Organen (Wesolowski *et al.*, 2009). Als Epitope werden die Bereiche eines Antigens bezeichnet, an denen sowohl Antikörper als auch Antikörperfragmente binden können (Jerne, 1960). Durch Mutations- und Selektionsmechanismen wird die bevorzugte Vermehrung der B-Zellen gewährleistet, die Immunglobuline mit einer hohen Affinität zum Antigen produzieren. Daher resultiert eine wiederholte Immunisierung auch in einer höheren Anzahl und optimierten Affinität der spezifischen Antikörper (Wesolowski *et al.*, 2009).

1.3.2. Antikörper und Schwerekettenantikörper

IgG-Antikörper sind die am häufigsten vorkommenden Immunglobuline und bestehen aus je zwei identischen schweren und leichten Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (vgl. Abbildung 1.7). Die schweren Ketten sind aus drei konstanten Regionen (CH: *Constant domain of heavy chain*) und einer variablen Region (VH: *Variable domain of heavy chain*) zusammengesetzt, wobei die CH3- und CH2-Sequenz über eine Hinge-Region mit der CH1- und VH-Sequenz verbunden ist. Die leichten Ketten bestehen jeweils aus einer konstanten (CL: *Constant domain of light chain*) und einer variablen Region (VL: *Variable domain of light chain*). Die variablen Regionen beider Ketten bilden mit den Domänen oberhalb der Hinge-Region das antigenbindende Fragment (Fab: *Antigen-binding fragment*), die übrigen konstanten Regionen des Antikörpers formen das kristallisierbare Fragment (Fc: *Crystallisable fragment*) (Wang *et al.*, 2007). Die N-terminalen Sequenzen der schweren und leichten Ketten dienen zur Bindung der Antigene, während die zwei CH-Sequenzen des Fc-Teils für die Rekrutierung von Immunzellen (z.B. Makrophagen und Killerzellen) und für Effektorfunktionen (z.B. Aktivierung des Komplementsystems) verantwortlich sind (Muyldermans, 2013). Dadurch können zum einen die *Antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) und zum anderen die *Complement-dependent cytotoxicity* (CDC) induziert werden, die jeweils zur Vernichtung der Krankheitserreger führen (Jiang *et al.*, 2011).

Neben konventionellen IgG-Antikörpern besitzen Tiere der Familie der Kamelartigen (Camelidae) und einige Vertreter der Klasse der Knorpelfische (Chondrichthyes) auch Schwerekettenantikörper (HCAb: *Heavy-chain antibodies*). Diese Immunglobuline besitzen keine leichten Ketten und im Fall der kameliden HCAs auch keine CH1-Sequenzen. Daher ist für die Bindung des Antigens nur eine Domäne (VHH: *Variable domain of camelid heavy chain antibody*) verantwortlich, die direkt über eine Hinge-Region mit dem Fc-Teil verbunden ist (Wesolowski *et al.*, 2009). Die rekombinant hergestellte und antigenspezifische VHH-Sequenz wird auch Nanobody oder Einzeldomänenantikörper genannt (Muyldermans, 2013). Bei den Vertretern der Camelidae können die Schwerekettenantikörper einen Anteil von 30 bis 70% an allen zirkulierenden Immunglobulinen ausmachen (Rissiek *et al.*, 2014) und liegen in zwei Varianten vor, die sich jeweils in der Länge ihrer Hinge-Region unterscheiden (Wesolowski *et al.*, 2009). In Abbildung 1.7 sind schematisch ein konventioneller IgG1-Antikörper, eine Variante der Schwerekettenantikörper mit einer kurzen Hinge-Region und ein Nanobody dargestellt.

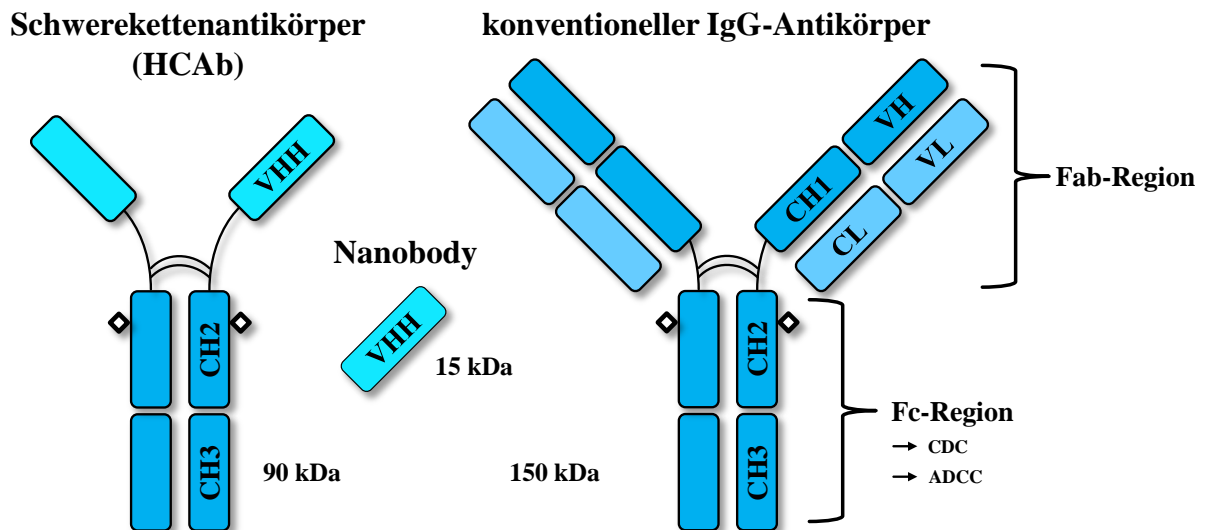


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung eines Schwerekettenantikörpers, eines Nanobodies und eines IgG-Antikörpers (in Anlehnung an Rissiek *et al.*, 2014; Conrath *et al.*, 2003). HCAb: Heavy-chain antibody. Fab: Antigen-binding fragment. Fc: Crystallisable fragment. ADCC: Antibody-dependent cellular cytotoxicity. CDC: Complement-dependent cytotoxicity. CH: Constant domain of heavy chain. VH: Variable domain of heavy chain. CL: Constant domain of light chain. VL: Variable domain of light chain. VHH: Variable domain of camelid heavy chain antibody.

1.3.3. Eigenschaften von Nanobodies

Mit ungefähr 15 kDa sind VHHs die kleinsten natürlich vorkommenden, antigenbindenden Proteindomänen. Dabei beruht der Begriff Nanobody auf der geringen Größe der rekombinant produzierten VHHs (Rissiek *et al.*, 2014). So zeigt die Kristallstruktur der Einzeldomänenantikörper eine gestreckte Form von nur 4.2 nm Länge und 2.5 nm Durchmesser (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013). Die drei hypervariablen Regionen sind zur Oberflächenstruktur der Epitope komplementär und werden deswegen *complementarity determining regions* (CDR) genannt. Sie werden von vier *framework regions* (FR) flankiert, wobei die FR1- und die FR3-Sequenz über eine konservierte Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Muyldermans, 2013). Auch liegen bei Nanobodies häufig zusätzliche Disulfidbrücken vor (Harmsen *et al.*, 2000), die einen Beitrag zur Stabilität leisten (Davies und Riechmann, 1996). Das Paratop konventioneller Antikörper besitzt eine nach innen gewölbte oder flache Oberfläche, wohingegen VHHs konvexe Paratope ausbilden, die bevorzugt an konkave Oberflächen der Antigene binden (Muyldermans, 2013). Durch ein Alignment der VH- und der VHH-Sequenzen wurde deutlich, dass sich die strukturelle Organisation der *framework regions* und den hypervariablen Regionen bis auf ein paar Ausnahmen in der FR2- und der CDR3-Sequenz ähnelt (Muyldermans, 2013). In der FR2-Sequenz wurden vier hochkonservierte hydrophobe Aminosäuren,

die normalerweise mit der variablen Domäne der leichten Ketten interagieren, durch kleinere bzw. hydrophilere Aminosäuren ersetzt (Harmsen *et al.*, 2000). Daher sind die Aminosäuresubstitutionen V42F, G49E, L50R und W52G ein prägnantes Merkmal der Nanobodysequenzen (Muyldermans, 2013). Sie vermindern die Neigung zur Aggregation und erhöhen die Wasserlöslichkeit des Proteins (Muyldermans, 2001). Da die Einzeldomänenantikörper und HCAs ohne die variable Domäne einer leichten Kette das Paratop ausbilden, werden Antigene nur durch drei hypervariable Regionen anstatt durch sechs gebunden (Muyldermans, 2013). Um die entsprechende Oberfläche zur Interaktion mit einem Epitop zu gewährleisten, sind die CDR-Sequenzen der VHHs entsprechend länger als bei VHs konventioneller Antikörper (Conrath *et al.*, 2003). Daher kann die CDR3-Sequenz fingerähnliche Formen ausbilden, die in Kavitäten von Antigenen eindringen und somit aktive Zentren von Enzymen blockieren können. Auf Grund der verlängerten hypervariablen Region findet oft eine Stabilisierung durch zusätzliche Disulfidbrücken statt (Wesolowski *et al.*, 2009). Demzufolge haben Nanobodies Zugang zu Epitopen, die von konventionellen Antikörpern nicht erreicht werden können (De Meyer *et al.*, 2014). In Abbildung 1.8 ist eine VHH-Sequenz eines Schwerekettenantikörpers mit ihren besonderen Eigenschaften schematisch dargestellt.

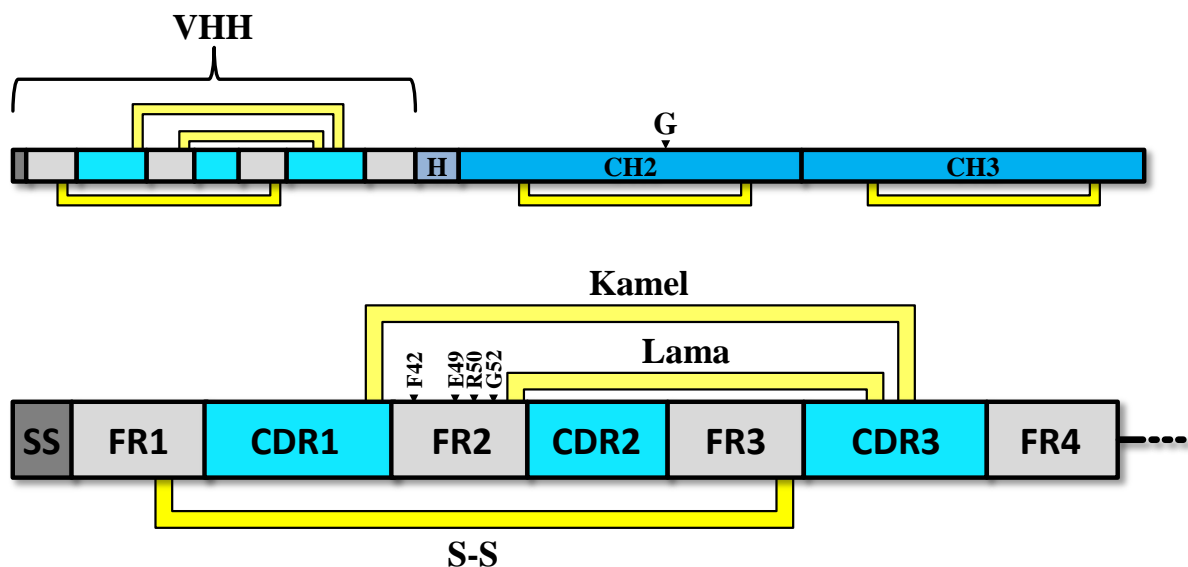


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung der VHH-Sequenz eines Schwerekettenantikörpers (in Anlehnung an Wesolowski *et al.*, 2009; Muyldermans, 2013; Conrath *et al.*, 2003). Zum einen sind die kanonischen Disulfidbrücken, welche die *framework region* 1 und 3 innerhalb der VHH-Sequenz miteinander verbinden, und zum anderen artspezifische Disulfidbrücken gelb dargestellt. Diese verbinden entweder die CDR3- mit der FR2-Sequenz (Lama) oder mit der CDR1-Sequenz (Kamel). In der FR2-Sequenz sind vier Aminosäuresubstitutionen aufgeführt, die charakteristisch für VHH-Sequenzen sind. VHH: *Variable domain of camelid heavy chain antibody*. H: Hinge-Region. CH: *Constant domain of heavy chain*. G: Glykosylierungssequenz. SS: Signalsequenz für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum während der Proteinbiosynthese. FR: *Framework region*. CDR: *Complementarity determining region*.

Darüber hinaus sind VHHs außerordentlich thermostabil. So wurde ein Nanobody zur Quantifizierung von Koffein in heißen Getränken generiert, der bei 70°C noch an das Antigen binden konnte. Des Weiteren war dieser Einzeldomänenantikörper auch nach einer Erhitzung auf 90°C noch funktional (De Meyer *et al.*, 2014). Daher besteht die Möglichkeit Nanobodies auch in Pflanzen herzustellen, die durch Sonneneinstrahlung hohen Temperaturen ausgesetzt sind. Auch können Nanobodies über Monate bei 4°C gelagert und über Wochen bei 37°C inkubiert werden, ohne dass ihre Fähigkeit zur Antigenbindung gemindert wird (Muyldermans, 2013). Zudem sind VHHs für orale Immuntherapien geeignet, da sie sowohl hohe als auch niedrige pH-Werte tolerieren und Antigene unter hohen Konzentrationen von chaotropen Reagenzien binden können (Harmsen und De Haard, 2007). Außerdem werden Nanobodies gewöhnlich erst bei 2.3-3.3 M Guanidinhydrochlorid und bei 60-80°C denaturiert (Muyldermans, 2013).

Weiterhin wurden VHHs und VHH-basierte Proteine erfolgreich in Bakterien, Pilzen, Säugetierzellen, Insekten und Pflanzen produziert (De Meyer *et al.*, 2014). Dabei wurden bei der transienten Herstellung von Nanobodies durch *Nicotiana benthamiana* Ausbeuten von bis zu 30% (Teh und Kavanagh, 2010) und bei stabil transformierten Tabakpflanzen bis zu 3.4% am löslichen Gesamtproteingehalt der Blattzellen erzielt (Ismaili *et al.*, 2007). Auch führt die Fusion der Nanobodies mit stabilisierenden Proteinen, wie einer β -Glucuronidase, Elastin-ähnlichen Polypeptiden oder humanen Fc-Teilen, zu deutlich höheren Ausbeuten in Pflanzen (De Meyer *et al.*, 2014). Darüber hinaus werden Einzeldomänenantikörper auch oft zur gezielten *in vivo* Inaktivierung von Proteinen verwendet, indem die Konformation, die Lokalisation oder die Funktion des Zielproteins beeinträchtigt wird (De Meyer *et al.*, 2014).

Auf Grund der einzigartigen Paratopstruktur, der einfachen Produktion durch unterschiedliche Organismen, der guten Wasserlöslichkeit, der exzellenten Thermostabilität, der hohen pH-Toleranz, und ähnlichen Affinitäten wie bei konventionellen IgG-Antikörpern mit K_D -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich bieten Nanobodies viele Vorteile für verschiedenste biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten (De Meyer *et al.*, 2014; Muyldermans, 2013; Conrad *et al.*, 2011; Harmsen und De Haard, 2007; Muyldermans, 2001).

1.4. Alternative Ansatzpunkte zur Reduktion der Malariaübertragung

Der Lebenszyklus der Plasmodien ist außerordentlich komplex, so dass die Parasiten jeweils eine spezialisierte Genexpression für das Leben in den Invertebraten- und Vertebraten-Wirten, zum Überleben innerhalb und außerhalb von Zellen, für die Invasion von vielen unterschiedlichen Zelltypen und zum Schutz vor den Immunantworten der infizierten Organismen benötigen (Florens *et al.*, 2002). Eine erfolgsversprechende Strategie zur Malariakontrolle ist die Ontogenese der parasitären Stadien innerhalb der weiblichen *Anopheles*-Mücken zu stören, da dort kritische Phasen in ihrer Entwicklung auftreten. So können zwar mehrere tausend Gametocyten durch eine Blutmahlzeit in den Mitteldarm gelangen, im Anschluss werden aber nur wenige Oocysten produziert. Auch werden von den zehntausenden Sporozoiten, die in die Hämolymphe entlassen werden, nur bis zu 100 durch einen Mückenstich auf den menschlichen Wirt übertragen (vgl. Abbildung 1.4) (Angrisano *et al.*, 2012; Sinden und Billingsley, 2001). Damit die verwendeten Wirkstoffe effektiv zur Inhibierung des Lebenszyklus sind, müssen sie spezifische Proteine zum Ziel haben, die für Entwicklung der Plasmodien essentiell sind (Florens *et al.*, 2002). So müssen sich die Parasiten gegen das menschliche Komplementsystem durch die Bindung von Faktor H schützen, da dieses nach einer Blutmahlzeit immer noch im Mitteldarm der Mücke aktiv ist (Simon *et al.*, 2013). Ein weiterer wichtiger Schritt zur Übertragung auf den Menschen ist die Invasion der Speicheldrüsen, welche anhand von organspezifischen Oberflächenproteinen durch die Sporozoiten in der Hämolymphe detektiert werden müssen (Ghosh und Jacobs-Lorena, 2009).

1.4.1. Rolle der Speicheldrüsenproteine von Mücken für die Entwicklung der Plasmodien

Nachdem die weiblichen *Anopheles*-Mücken über eine Blutmahlzeit infizierte Erythrozyten aufgenommen haben, beginnt die Entwicklung der Plasmodien innerhalb des Mitteldarms durch die Befruchtung einer weiblichen Makrogamete. Als nächstes penetriert die entstandene Ookinete das Mitteldarmepithel, so dass unter der Basallamina die Bildung einer sessilen Oozyste stattfindet. Dort werden dann innerhalb von zwei Wochen tausende Sporozoiten in das Hämolympsystem der Mücke entlassen (Matuschewski, 2006). Die Sporozoiten müssen nun über spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen die Speicheldrüsen identifizieren und invadieren, wo sie dann bis zur Übertragung auf einen neuen Wirt verbleiben (Wang *et al.*, 2013). Für diesen Prozess wurden bisher mehrere essentielle Oberflächenproteine der Speicheldrüsen und der Sporozoiten identifiziert (Ghosh *et al.*, 2009; Ghosh und Jacobs-Lorena, 2009; Wang *et al.*, 2013).

In komplexen Vorgang der Speicheldrüseninvasion nimmt die Bindung von TRAP an Saglin eine zentrale Rolle ein. Dabei bindet das *thrombospondin related anonymous protein* (TRAP) der Sporozoiten an das 100 kDa große Homodimer Saglin, welches auf den distalen und dem Hämocoel zugewandten Lappen der Speicheldrüsen lokalisiert ist (Ghosh *et al.*, 2009). TRAP wird während der Ausdifferenzierung der Sporozoiten gebildet, in den Mikronemen gespeichert und ist für die Fortbewegung und für die Invasion der Speicheldrüsen essentiell (Ghosh und Jacobs-Lorena, 2009). Wenn Antikörper gegen Saglin von weiblichen *Anopheles*-Mücken über die Nahrung aufgenommen werden, wird die Invasion der Sporozoiten um ungefähr 75% reduziert (Ghosh und Jacobs-Lorena, 2009). Des Weiteren wurde durch eine Injektion sequenzspezifischer dsRNA in das Hämocoel von *Anopheles gambiae* die Expression des für Saglin codierenden Gens mittels RNA-Interferenz inhibiert. Dabei war die Sporozoitenanzahl in den Speicheldrüsen der infizierten Mücken im Vergleich zur Kontrollgruppe um bis zu 97% niedriger (Ghosh *et al.*, 2009).

Zusätzlich bindet das *circumsporozoite protein* (CSP) der Sporozoiten an das *CSP-binding protein* (CSPBP) der Speicheldrüsen. Das Protein ist über einen GPI-Anker auf der Oberfläche der Plasmodien befestigt und sowohl für die Entwicklung der Sporozoiten in den Oocysten als auch für die Speicheldrüseninvasion notwendig. Durch die Inhibierung der Genexpression des *CSP*-Gens mittels Injektion von sequenzspezifischer dsRNA wurde die Sporozoitenanzahl in den Speicheldrüsen erheblich erniedrigt (Wang *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde durch die Verwendung von CSP-Proteinen, CSP-Fragmenten oder Antikörpern gegen CSP die Anzahl der eingedrungenen Sporozoiten stark reduziert, so dass damit die Beteiligung des Proteins an der Speicheldrüseninvasion nachgewiesen werden konnte (Ghosh und Jacobs-Lorena, 2009; Wang *et al.*, 2013).

Bei *apical membrane antigen/erythrocyte binding-like* (MAEBL)-Proteinen handelt es sich um 200 kDa große, hochkonservierte Transmembranproteine der Plasmodien. Sie kommen sowohl bei Merozoiten als auch bei Sporozoiten vor und sind in den Mikronemen oder auf der Zelloberfläche lokalisiert (Ghosh und Jacobs-Lorena, 2009; Kappe *et al.*, 2004). Knockout-Sporozoiten war es nicht mehr möglich in die Speicheldrüsen zu gelangen, wohingegen Merozoiten weiterhin in rote Blutkörperchen eindringen konnten. Für MAEBL-Proteine wurde der entsprechende Ligand bisher noch nicht identifiziert (Wang *et al.*, 2013).

1.4.2. Funktion von Faktor H für die Entwicklung der Plasmodien

Während des Lebenszyklus der *Anopheles*-Mücken benötigen die weiblichen Insekten eine Blutmahlzeit, da sie die aufgenommenen Proteine und Eisenionen zur Produktion von Eiern benötigen (Zhou *et al.*, 2007). Dabei nehmen die Mücken in sehr kurzer Zeit bis zu mehr als die doppelte Menge

an Flüssigkeit im Vergleich zu ihrem Lebensgewicht auf und sind anschließend mit dem angeborenen Immunsystem des Wirtes in ihrem Darmtrakt konfrontiert (Khattab *et al.*, 2015). So ist das menschliche Komplementsystem noch mindestens eine Stunde im Mitteldarm der Mücken aktiv (Simon *et al.*, 2013) und lysiert dort auf Grund der komplementabhängigen Zytolyse vorkommende Mikroorganismen (Khattab *et al.*, 2015). Durch die Blutmahlzeit von einem an Malaria erkrankten Menschen gelangen auch Erythrozyten, die mit Plasmodien infiziert sind, in den Mitteldarm des Insekts. Die Parasiten verlassen dort die roten Blutkörperchen zur sexuellen Reproduktion (Angrisano *et al.*, 2012) und müssen sich nun im Darmlumen vor dem alternativen Weg des menschlichen Komplementsystems schützen. Dazu binden die Plasmodien an ihrer Oberfläche Faktor H, um so menschliche Zellen nachzuahmen (Zipfel *et al.*, 2007, Simon *et al.*, 2013). Daher wurde in einem Fütterungsexperiment mit einem Ansatz aus Gametozyten, normalen menschlichen Serum, frischen menschlichen Erythrozyten und monoklonalen Anti-Faktor H-Antikörpern gezeigt, dass die Entwicklung der Plasmodien im Mitteldarm der weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken effektiv durch die komplementabhängige Zytolyse inhibiert werden kann (Simon *et al.*, 2013).

Das menschliche Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und basiert auf einem regulierten Netzwerk von mehr als 30 Proteinen (Sarma und Ward, 2011). Die Aufgaben bestehen in der Opsonisierung, der Rekrutierung anderer Proteine und Zellen zur Zerstörung der markierten Ziele und in der Bildung einer Membranpore zur osmotischen Lyse von Pathogenen (Chaplin, 2010). Zudem werden durch die Ausschüttung von Anaphylatoxinen die Durchlässigkeit von Blutkapillaren erhöht und Phagozyten durch Chemotaxis zu den Krankheitserregern geführt (Sarma und Ward, 2011). Die Aktivierung des Komplementsystems kann über den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg initiiert werden (Sarma und Ward, 2011). Dabei sind viele der beteiligten Proteine Proteinasen und liegen als inaktive Enzymvorstufen (Zymogene) vor. Durch die Aktivierung des Komplementsystems wird eine Kaskade von enzymatischen Reaktionen ausgelöst, indem die Zymogene sequentiell proteolytisch aktiviert werden (Chaplin, 2010). Der klassische Weg des Komplementsystems wird durch die Bindung von C1q an die Fc-Region von IgG- oder IgM-Antikörpern und der nachfolgenden Assemblierung des C1-Komplexes initiiert. Durch die anschließende Spaltung von C4 und C2 wird die C3-Konvertase C4bC2a gebildet (Sarma und Ward, 2011). Der Lektin-Weg wird durch die Bindung des Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Zuckerresten auf der Oberfläche von Pathogenen induziert. Durch die Aktivierung der assoziierten MASP-Proteasen werden C4- und C2-Moleküle gespalten, so dass analog zum klassischen Weg die C3-Konvertase C4bC2a gebildet wird (Sarma und Ward, 2011). Der alternative Weg wird hingegen ohne spezifische Erkennungsmoleküle wie C1q oder MBL ausgelöst, sondern durch eine

kontinuierliche Autohydrolyse von C3, die zur Bildung von C3b führt (Ferreira *et al.*, 2010). Die C3b-Moleküle binden kovalent über einen Thioester an Hydroxyl- und Aminogruppen von Zuckerketten oder Aminosäureresten an Zelloberflächen (Dodds *et al.*, 1996). Das gebundene C3b kann nun mit Faktor B assoziieren, welcher daraufhin durch Faktor D gespalten wird. Dadurch wird die membrangebundene C3-Konvertase C3bBb gebildet (Ferreira *et al.*, 2010). Jeder der drei Wege führt zur Bildung einer C3-Konvertase, die durch Spaltung von weiteren C3-Molekülen die Aktivierung des Komplementsystems verstärkt. Dabei fungiert C3a als Anaphylatoxin und C3b als Opsonin. Des Weiteren werden C5-Konvertasen durch die Assoziation von C3b-Fragmenten mit den C3-Konvertasen gebildet. Auf Grund der proteolytischen Spaltung von C5-Komplementkomponenten durch die C5-Konvertasen werden Komplexe generiert, welche die Membran angreifen und durch Porenbildung eine osmotische Zelllyse induzieren (Sarma und Ward, 2011).

Damit das Komplementsystem nicht ungewollt das menschliche Gewebe schädigt, existieren mehrere regulatorische Plasma- und Membranproteine (Chaplin, 2010). So wird der alternative Weg des Komplementsystems maßgeblich durch Faktor H reguliert, der das häufigste Plasmaprotein im menschlichen Körper ist (Simon *et al.*, 2013). Das Protein besteht aus 20 homologen CCP-Modulen (*complement control protein*) und hat eine Größe von 155 kDa. Die regulatorische Wirkung besteht zum einen in der Auslösung eines beschleunigten Abbaus der C3-Konvertase C3bBb und zum anderen in der Funktion als Kofaktor zur Degradation von C3b durch Faktor I in die inaktive Form iC3b (Simon *et al.*, 2013). Faktor H bindet an polyanionische Strukturen auf den Oberflächen menschlicher Zellen wie Glykosaminoglykanen (GAG) und Sialinsäuren, die normalerweise nicht bei Mikroorganismen vorkommen (Khattab *et al.*, 2015), und weist in deren Gegenwart eine zehnfach höhere Affinität zu C3b auf (Ferreira *et al.*, 2010).

Durch die Koevolution von Parasiten mit deren Wirten haben viele pathogene Mikroorganismen Mechanismen zur Inhibierung des menschlichen Komplementsystems entwickelt. So ist eine verbreitete Strategie die Bindung von regulativen, menschlichen Komplementärproteinen, um die Oberflächen der Wirtszellen nachzuahmen (Simon *et al.*, 2013). Daher schützen sich sowohl die Gameten von *Plasmodium falciparum* als auch die Mitteldarmzellen der Mücken durch Bindung von Faktor H vor der komplementabhängigen Zytolyse (Khattab *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2013). Dieser Mechanismus ist für die Gameten in Abbildung 1.9 schematisch dargestellt.

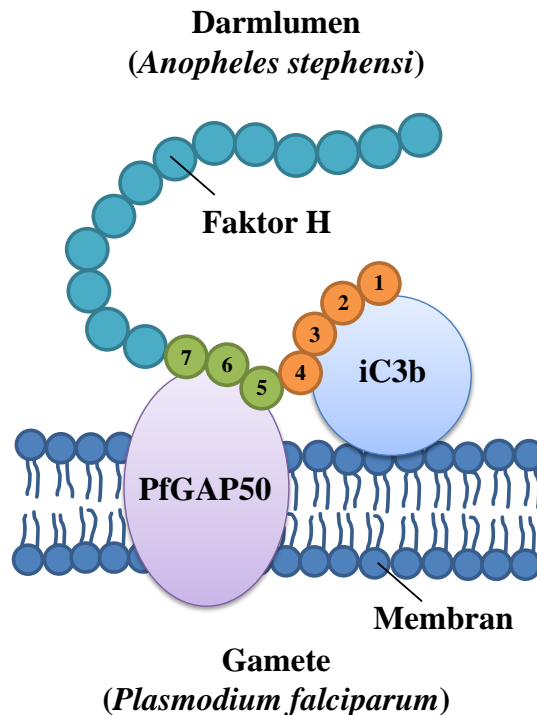


Abbildung 1.9 Mechanismus zum Schutz vor der komplementabhängigen Zytolyse von *Plasmodium falciparum* (in Anlehnung an Simon *et al.*, 2013). Die Gameten im Mitteldarm der Mücke schützen sich vor dem menschlichen Komplementsystem durch Bindung von Faktor H mittels des Proteins PfGAP50. Dadurch werden C3b-Proteine durch Spaltung von Faktor I inaktiviert und die Gameten entgehen einer Vernichtung durch die komplementabhängige Zytolyse. Faktor H wird an der Oberfläche der Gameten über die Module CCP5-CCP7 durch PfGAP50 gebunden. Die Bindung von C3b findet über die Module CCP1-CCP4 statt. Die proteolytische Spaltung von C3b erfolgt anschließend durch Faktor I, so dass C3b in die inaktive Form iC3b überführt wird.

1.5. Zielsetzung

Malaria hat einen verheerenden Einfluss auf die politische, soziale und ökonomische Stabilität in wirtschaftlich schwachen Staaten. So ist die infektionsbedingte Sterblichkeitsrate in vielen afrikanischen Ländern weiterhin sehr hoch, während nur ein limitierter Zugang zu wirkungsvollen Behandlungsmöglichkeiten besonders in ländlichen Gebieten besteht (Miller *et al.*, 2002; Gazzinelli *et al.*, 2014). Des Weiteren wird die erfolgreiche Malariakontrolle durch aufkommende Wirkstoffresistenzen der Plasmodien, Insektizidresistenzen der *Anopheles*-Mücken sowie durch das Fehlen eines effizienten Impfstoffes maßgeblich beeinträchtigt (WHO, 2014). Da die konventionellen Methoden keinen Erfolg in der Reduzierung der Malariaübertragung aufweisen, müssen dringend alternative Strategien entwickelt werden. So eignen sich besonders transgene Pflanzen zur Produktion rekombinanter Proteine in ressourcenarmen Ländern mit einer schlechten technologischen Infrastruktur (Conrad *et al.*, 2011). Sie sind einfach zu kultivieren und können komplexe Proteine

assemblieren, posttranslationale Modifikationen durchführen und rekombinante Proteine mit einer hohen Ausbeute produzieren (De Buck *et al.*, 2013). Dies macht sie zu einem vielseitiges Hilfsmittel zur Produktion von pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen (Conrad *et al.*, 2011). Eine mögliche Strategie zur Malariakontrolle ist, den Lebenszyklus der Malariaerreger innerhalb der weiblichen *Anopheles*-Mücken zu inhibieren, so dass die Plasmodien nicht mehr auf den Menschen übertragen werden können.

Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Entwicklung einer Methode zur Reduktion der Malariaübertragung geleistet werden, die besonders in Gebieten mit einer schlechten medizinischen Infrastruktur eingesetzt werden kann. Neben der Blutmahlzeit zur Produktion von Eiern brauchen adulte Mücken zum Überleben natürliche Zuckerquellen, welche primär aus floralem Pflanzennektar bestehen (Gu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2007). Durch die Verwendung transgener Pflanzen, die rekombinante Proteine oder dsRNA in ihrem Nektar produzieren, würden die Wirkstoffe durch die Nahrungsaufnahme in den Verdauungstrakt der Mücken gelangen. Dort sollen sie essentielle Schritte innerhalb des Lebenszyklus der Plasmodien inhibieren, so dass deren Übertragung auf Menschen verhindert wird. Die Antimalaria-Pflanzen könnten kosteneffizient in der Nähe von Gewässern und menschlichen Behausungen angepflanzt werden, ohne dass eine weitere intensive Pflege von Nöten wäre. Um die Grundlagen zur Herstellung dieser transgenen Pflanzen zu schaffen, wurden folgende Strategien zur Reduktion der Malariaübertragung untersucht:

1. Im ersten Teil der Dissertation sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob mit pflanzlich hergestellter dsRNA die Expression von Genen, welche für die Produktion von Speicheldrüsenproteinen der Mücken verantwortlich sind, herunterreguliert werden kann. Dazu sollte stellvertretend die Expression eines *apyrase*-Gens von *Anopheles stephensi* reduziert werden. Apyrasen befinden sich in den Speicheldrüsen von Hämatophagen und sind bei Mücken für die Lokalisation der Adern zur Blutmahlzeit sowie für die Inhibition der Blutgerinnung verantwortlich (Boisson *et al.*, 2006). Zur posttranskriptionellen Genregulation sollte dsRNA, die eine Haarnadelstruktur ausbildet, mit Hilfe einer stabil transformierten Tabakpflanzenlinie hergestellt werden. Anschließend sollte in einem Fütterungsversuch mit weiblichen *Anopheles*-Mücken überprüft werden, ob die Produktion der Apyrase durch Applikation sequenzspezifischer dsRNA mittels RNA-Interferenz *in vivo* inhibiert werden kann.

-
2. Der zweite Teil der Dissertation basiert auf den Forschungsergebnissen von Simon *et al.* (2013), welche die Rolle von Faktor H für die Entwicklung der Plasmodien in den *Anopheles*-Mücken untersuchten. Während der Fütterung von weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken mit infiziertem, menschlichem Blut wurde Faktor H durch die Zugabe eines monoklonalen Antikörpers funktionell inaktiviert. Dadurch wurden die Plasmodien im Mitteldarm der Mücken durch den alternativen Weg des menschlichen Komplementsystems lysiert und der Lebenszyklus des Malariaerregers wurde an dieser Stelle unterbrochen (Simon *et al.*, 2013).

In Anlehnung an diese Forschungsergebnisse sollten Nanobodies generiert werden, die analog zu den Antikörpern eingesetzt werden können. Dazu sollte zunächst eine Phagenbibliothek hergestellt werden, um anschließend gegen Faktor H bindende Nanobodies durch die Ausführung eines Phagen-Displays zu identifizieren. Anschließend sollten die selektierten VHHs mit einem bakteriellen Expressionssystem produziert und im Anschluss bezüglich ihrer Bindungseigenschaften zu Faktor H charakterisiert werden. Als nächstes sollten die Nanobodies in einem *in vivo* Fütterungsversuch auf ihre inhibitorische Wirkung auf den Lebenszyklus der Plasmodien überprüft werden. Zuletzt sollten die identifizierten Nanobodies mit einem Fc-Teils eines humanen IgG1-Antikörper fusioniert und transient in Tabakpflanzen produziert werden. Nach einer erfolgreichen Herstellung der rekombinanten Fusionsproteine sollte ebenfalls deren Charakterisierung erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage ATILON ATL-84-I	AccuLab Sartorius (Göttingen)
Autoklav Systec V-65	Systec (Wettenberg)
Brutschrank B 5050 E	Heraeus (Hanau)
Cast-It Gelgießstand	VWR International (Radnor, USA)
Consort EV Power SupplyEV202	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Digitalkamera PowerShot A630	Canon (Krefeld)
Digital pH-Meter Typ 647-1	Knick (Berlin)
<i>E. coli</i> Pulser™	Bio-Rad (Hercules, USA)
Elektrophorese Power Supply PAC 300	Bio-Rad (Hercules, USA)
Eppendorf Research 300 (multi-channel)	Eppendorf (Hamburg)
Gene Pulser® II	Bio-Rad (Hercules, USA)
Heraeus Sepatech Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau)
Inkubationsschüttler Ecotron	Infors (Bottmingen, CH)
Intas UV-System	Intas (Göttingen)
Magnetrührer RCT Basic	IKA (Staufen)
Mastercycler epgradient S	Eppendorf (Hamburg)
Microplate Reader INFINITE® M200	Tecan (Männedorf, CH)
Mikrowelle R-93ST-A	Sharp (Ōsaka, Japan)
NanoDrop ND - 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Octet RED96	FortéBio (Menlo Park, USA)
PerfectBlue Gelsystem	VWR International (Radnor, USA)
PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web	VWR International (Radnor, USA)
PerfectBlue™ Twin	VWR International (Radnor, USA)
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Präzisionswaage Atilon ATL-2202	AccuLab Sartorius (Göttingen)
Schüttler MaxQ 4450	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
StepOne™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Suprasil Quarzküvette QS	Hellma (Müllheim)

Thermoblock Typ 5000 6101	Liebisch (Bielefeld)
Thermocycler PCR Primus 25 advanced	VWR International (Radnor, USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	NeoLab (Heidelberg)
Ultraschallbad Sonorex RK100H	Bandelin electronic (Berlin)
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD60	Bandelin electronic (Berlin)
UV-Küvette Mikro	Brand (Wertheim)
Vakuumpumpe Leybold D2	Oerlikon Leybold Vacuum (Köln)
Vortex Mixer Typ 7-2020	NeoLab (Heidelberg)
Wasserbad	Köttermann (Uetze / Hänigsen)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2. Chemikalien

Aceton	AppliChem (Darmstadt)
Acrylamid-Lösung	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	AppliChem (Darmstadt)
p-Aminobenzoessäure (PABA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Merck (Darmstadt)
Bacto-Agar	AppliChem (Darmstadt)
Benzylaminopurin	Duchefa (Haarlem, NL)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol (Hamburg)
Bradford-Lösung	AppliChem (Darmstadt)
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt)
Calciumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	AppliChem (Darmstadt)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blau G-250	AppliChem (Darmstadt)
Desoxynukleotide	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Diethanolamin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Essigsäure	AppliChem (Darmstadt)

Ethanol	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)
Formaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe)
Gamborg B5 Vitamine	Duchefa (Haarlem, NL)
Glucose	AppliChem (Darmstadt)
Glycerol	AppliChem (Darmstadt)
Glykogen, RNA grade	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	AppliChem (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumacetat	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	AppliChem (Darmstadt)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	AppliChem (Darmstadt)
Mangan(II)-chlorid	AppliChem (Darmstadt)
D-Mannitol	AppliChem (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	AppliChem (Darmstadt)
Methanol	AppliChem (Darmstadt)
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	AppliChem (Darmstadt)
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	AppliChem (Darmstadt)
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa (Haarlem, NL)
Myo-Inositol	AppliChem (Darmstadt)
Nancy-520	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
1-Naphtylelessigsäure	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumascorbat	AppliChem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)

di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydroxid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhypochlorit	AppliChem (Darmstadt)
Pepton aus Casein	AppliChem (Darmstadt)
Phosphatase Substrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phyto-Agar	Duchefa (Haarlem, NL)
Polyethylenglycol 6000	Merck (Darmstadt)
Rubidiumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe)
Silwet 77	Ge Specialty Materials (Fairfield, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem (Darmstadt)
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B ₁)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Triethylamin (TEA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100	AppliChem (Darmstadt)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)

2.1.3. Antibiotika

Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Carbenicillin	Duchefa (Haarlem, NL)
Gentamicin	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycin	AppliChem (Darmstadt)
Rifampicin	AppliChem (Darmstadt)
Streptomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Timentin	Duchefa (Haarlem, NL)

Tabelle 2.1 Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion und Kultivierung von transgenen Bakterien und Pflanzen.

Antibiotikum	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin	100
Carbenicillin	100
Kanamycin	50
Rifampicin	50
Gentamicin	15
Streptomycin	50
Timentin	100

2.1.4. Puffer und Lösungen

PBS

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
2 mM KH_2PO_4
pH 7.4
autoklaviert

PBST

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
2 mM KH_2PO_4
0.05% (v/v) Tween 20
pH 7.4

Pfu-Puffer (10×)

200 mM Tris-HCl (pH 8.8)
100 mM KCl
100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
20 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1% (v/v) Triton X-100
autoklaviert
1 mg/ml BSA

Taq-Puffer (10×)

100 mM Tris-HCl (pH 8.8)
500 mM KCl
0.8% (v/v) Triton X-100
autoklaviert

RNase-Lösung (1 ml)

10 mg RNase
900 μl 1 M Na-Acetat pH 5.2
100 μl 100 mM Tris-HCl pH 7.4

TES

0.5 M Saccharose
0.2 M Tris-HCl pH 8.0
0.5 mM EDTA
autoklaviert und Lagerung im Dunkeln bei 4°C

2.1.5. Nährmedien

Bakterienmedien:

LB-Medium

10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
pH 7.0

LB-Nähragar

10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
15 g/l Bacto-Agar
pH 7.0

LB-2% (w/v) Glucose-Nähragar

10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
20 g/l Glucose
15 g/l Bacto-Agar
pH 7.0

2×TY-Medium

16 g/l Bacto-Trypton
10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl

YEB-Medium

5 g/l Rindfleisch-Extrakt
1 g/l Hefeextrakt
5 g/l Pepton
5 g/l Saccharose
493 mg/L MgSO₄
pH 7.8

TB-Medium

12 g/l Bacto-Trypton
24 g/l Hefeextrakt
4 ml/l Glycerol
2.31 g/l KH₂PO₄
12.54 g/l K₂HPO₄

Minimal-2% (w/v) Glucose-Agarplatten

100 ml/l M9 Salze (10×)
1 ml/l 1 M MgSO₄
1 ml/l 100 mM CaCl₂
5 ml/l Vitamin B1 (=Thiamine-HCl) (1 mg/ml)
10 ml/l 20% (w/v) Glucose
15 g/l Bacto-Agar

M9 Salze (10×)

74.76 g/l Na₂HPO₄×2 H₂O
30 g/l KH₂PO₄
10 g/l NH₄Cl
5 g/l NaCl

Pflanzenmedien:

MS-Medium

4.3 g/l MS-Salze
30 g/l Saccharose
0.1 g/l Myo-Inositol
1 ml/l Gamborg B5 Vitamine
7 g/l Phyto-Agar
pH 5.7

RMOP Medium

4.3 g/l MS-Salze
30 g/l Saccharose
0.1 g/l Myo-Inositol
1 ml/l BAP (1 mg/ml 0.1 M NaOH)
0.1 ml/l NAA (1 mg/ml)
4.3 g/l Phyto-Agar
pH 5.8

2.1.6. Kits

CheLuminate-HRP PicoDetect

E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I, Omega Bio-tek[®]

E.Z.N.A.[®] MicroElute Gel Extraction Kit Omega Bio-tek[®]

GenElute[™] Gel Extraction Kit

GenElute[™] Mammalian Total RNA Miniprep Kit

GenElute[™] PCR-Clean Up Kit

iTaq[™] Universal SYBR[®] Green Supermix

NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up-Kit

peqGOLD Trifast[™]

RNA Clean & Concentrator[™] -100

2× SensiMix[™]-SYBR & ROX Kit

Zero Blunt[®] PCR Cloning Kit

AppliChem (Darmstadt)

VWR International (Radnor, USA)

VWR International (Radnor, USA)

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Bio-Rad (Hercules, USA)

Macherey-Nagel (Düren)

VWR International (Radnor, USA)

Zymo Research Corp. (Irvine, USA)

VWR International (Radnor, USA)

Life Technologies (Carlsbad, USA)

2.1.7. Enzyme und Proteine

DNase I, RNase-free, 1 U/μl

Faktor H (1.04 mg/ml)

FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase

FastStart *Taq* DNA Polymerase

Pfu DNA Polymerase

PageRuler[™] Prestained Protein Ladder

Restriktionsenzyme

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Merck Millipore (Billerica, USA)

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Life Technologies (Carlsbad, USA)

Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)

Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNase	AppliChem (Darmstadt)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 10K Devices	Merck-Millipore (Darmstadt)
Badesalz – Totes Meer	Murnauer Markenvertrieb (Egelsbach)
Blotting Paper Sheets, Grade BF 2	Munktell (Falun, Schweden)
Brekkies – Katzentrockenfutter	Affinity (Sant Cugat del Vallés, Spanien)
Einweg-Zellschaber	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Elektroporationsküvetten, 1 mm Spalt	VWR International (Radnor, USA)
Entwickler-Konzentrat, GBXE	Kodak (Rochester, USA)
FastStart PCR Buffer (10×) mit 20 mM MgCl ₂	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Gene Pulser [®] Cuvette, 0.1 cm electrode gap	Bio-Rad (Hercules, USA)
GeneRuler [™] 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Immobilon-P, PVDF Membran	Carl Roth (Karlsruhe)
Lebensmittelfarbe (rot)	Brauns-Heitmann (Warburg)
MicroAmp [®] 48-Well Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MicroAmp [®] Fast Optical 48-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Miracloth	Merck-Millipore (Darmstadt)
Ni-NTA Biosensors	FortéBio (Menlo Park, USA)
Nunc-Immuno Plate F96 Maxisorp	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Parafilm [®]	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Petrischale quadratisch (100×100×20 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pierce [™] Protein-Free (PBS) Blocking Buffer	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10 µl	Sarstedt (Nümbrecht)
Protino [®] Ni-TED Resins	Macherey-Nagel (Düren)
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
2×RNA-Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rotilabo [®] -Faltenfilter	Carl Roth (Karlsruhe)

Röhren - 50 ml und 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Röntgenfilm Typ Fujifilm Super RX	Fujifilm (Tokio, Japan)
Röntgen Fixierbad, GBXF	Kodak (Rochester, USA)
SmartLadder	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Square Petri Dish	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
1-Step Turbo TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
T4 DNA Ligase Buffer (10×)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tissue Culture Plate 24-Well (Flat Bottom Lid)	Sarstedt (Nümbrecht)
Tuberkulinspritzen, 1 ml	Hartenstein (Würzburg)
Wasser, DEPC-treated	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Wattepads	dm-drogerie markt (Karlsruhe)
96 Well Flat Bottom TC-Treated Microplates	Corning Inc. (New York, USA)
96 Well Black Flat Bottom Microplates	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

2.1.9. Primer

In der Tabelle 2.2 sind Primer aufgeführt, die zur Amplifikation und Klonierung von DNA-Sequenzen verwendet wurden. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 2.2 Auflistung der verwendeten Primer. Die Darstellung der Primer erfolgt vom 5'- zum 3'-Ende der DNA-Sequenz.

Name	DNA-Sequenz (5' → 3')
CALL001	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
CALL002	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
Primer 38	GACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT
Primer A6E	GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
Primer RP	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
Primer GIII	CCACAGACAGCCCTCATAG
Primer FP	TTCCCAGTCACGAC
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
pAPY101	CGGGCTCGTGGCTTTGTCTCTTG
pAPY201	CAGAACTTCCGGGTCCTGTTGGAC
pAPY301	ACCTCGAGTCTAGACAACGATCTGCACGCACGG
pAPY401	TCGGTACCAAGCTTCGCCAACCTTTAGCACAACGC
pAPY501	TTGGATTGATTACAGTTGGGAAATTGG
pAPY601	GCAAATATCATGCGATCATAGGCGTC
pHAN701	CACTGACGTAAGGGATGACGCAC
pHAN801	CTTCTTCGTCTTACACATCACTTGTC
pAPY111	CGAGCCAGAAGTCTTCCGACTGTACC
pAPY222	TCTTTAGCTTCTTGATCGTGTGATACACGC
pAPY333	GCGTGCAGGAAATTCAAATCGTCGATGC
pAPY444	CGGTCCGTACCCTGTTTCAACATTTTCG
pRT111	CACCGCTGTGTACGATGCCATCC
pRT222	ATGGTGGTCTGCTGGTTCTTATCCAGG
pODT201	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT

2.1.10. Bakterienstämme

***Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies, Carlsbad, USA)**

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX*74 *nupG* *recA1* *araD*139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE*15 *galK*16 *rpsL*(*strR*) *endA1* *nupG* λ -

***Escherichia coli* TG1 (Lucigen, Middleton, USA)**

Genotyp: F'[*traD*36 *proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ M15] *supE* *thi*-1 Δ (*lac-proAB*) Δ (*mcrB-hsdSM*)5 (*r_K*⁻*m_K*⁻)

***Escherichia coli* DH5 α (Grant *et al.*, 1990)**

Genotyp: F⁻ *supE*44 *endA1* *glnV*44 *thi*-1 *recA1* *relA1* *gyrA*96 *deoR* *nupG* Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacU*169 *hsdR*17 (*r_K*⁻*m_K*⁻) λ -

***Escherichia coli* WK6 (Zell und Fritz, 1987)**

Genotyp: F'[*traD*36 *proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ M15] Δ (*lac-proAB*) *galE* *naI* *strA*

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (DSMZ, Braunschweig)**

Ti-Plasmid: pMP90

Marker: Rifampicin^R, Gentamicin^R

***Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Icon Genetics, Halle)**

Ti-Plasmid: pAL4404

Marker: Rifampicin^R, Streptomycin^R

2.1.11. Bakteriophagen

M13K07-Phagen (Life Technologies, Carlsbad, USA): Der M13K07-Phage ist ein Derivat der filamentösen Bakteriophage M13 und wird als Helferphage beim Phagen-Display (2.2.5) verwendet. Die M13K07-Phagen besitzen den Replikationsursprung des Plasmids p14A, die Mutation Met40Ile in der GenII-Sequenz und ein Resistenzgen des Transposons Tn903 gegen Kanamycin (Vieira und Messing, 1987). Die Infektion von *E. coli*-Bakterien findet über deren F-Pili statt und die Replikation der Phagen erfolgt ohne Absterben der Wirtszellen. Mit Hilfe der M13K07-Phagen wird eine Wildtypform des pIII-Proteins hergestellt. Dieses Oberflächenprotein wird benötigt, um in Kombination mit Phagemiden infektiöse Phagen zu produzieren. Durch eine modifizierte intergenische

Region wird die einzelsträngige DNA eines Phagemids mit einem Wildtyp f1-Replikationsursprung bevorzugt in das Capsid verpackt, welches anschließend in das Kulturmedium sekretiert wird (Carmen und Jermutus, 2002). Auf diese Art und Weise hergestellte Phagen werden schließlich beim Panning verwendet (2.2.5.2).

2.1.12. Plasmide

pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001):

Mit Hilfe des Vektors pHANNIBAL können aus einfachen PCR-Produkten doppelsträngige RNA-Sequenzen generiert werden, die Haarnadelstrukturen ausbilden. Diese *hairpin* RNAs (hpRNA) eignen sich zur Induzierung der RNA-Interferenz, um die Expression eines Zielgens herunterzuregulieren. Zur Klonierung werden eine *sense* und eine *antisense*-Sequenz über zwei Polylinker in das Plasmid ligiert. Beide eingefügten Sequenzen sind dann durch ein Intron des *pyruvat orthophosphat dikinase*-Gens von *Flaveria trinervia* voneinander getrennt, so dass sich eine 30-50 bp große Schleife ausbilden kann. Die Expressionskassette wird dann später über eine *NotI*-Schnittstelle in einen pflanzlichen Expressionsvektor ligiert. Die Produktion der hpRNA erfolgt anschließend über einen konstitutiven 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus und einen Terminator des *octopinsynthase*-Gens. Die Selektion der Bakterien erfolgt mit Hilfe eines Resistenzgens gegen Ampicillin. Die Plasmidkarte ist im Anhang (vgl. Abbildung 7.5) dargestellt.

pART27 (Gleave, 1992):

Der binäre Vektor pART27 (vgl. Abbildung 7.6) wird mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers zur Herstellung von stabil transformierten Pflanzen verwendet, die dsRNA mit einer Haarnadelstruktur ausbilden sollen. Dazu muss eine entsprechende Expressionskassette über eine *NotI*-Schnittstelle innerhalb der *lacZ*-Region inseriert werden. Das Plasmid besitzt ein RK2-Replikon zur Replikation in Agrobakterien und ein ColE1-Replikon zur Amplifikation in *E. coli*-Bakterien. Zur Selektion in Bakterien liegt ein Resistenzgen gegen Streptomycin und Spectinomycin und zur Selektion in Pflanzen ein Resistenzgen gegen Kanamycin vor. Die eingebaute Expressionskassette befindet sich zusammen mit dem Gen zur Selektion der transformierten Pflanzenzellen zwischen einer LB (*left border*)- und einer RB (*right border*)-Sequenz. Dieser flankierte Bereich kann mit Hilfe von Agrobakterien in das pflanzliche Genom eingebaut werden.

pCRTM-Blunt (Thermo Fisher Scientific, Waltham):

Der pCRTM-Blunt-Vektor wird als Klonierungsvektor verwendet und liegt in linearisierter Form vor. Die Insertion eines glatten (*blunt end*) DNA-Fragments erfolgt in ein *ccdB*-Gen (*control of cell death*), wodurch es inaktiviert wird. Das toxische CcdB-Protein führt zum Zelltod der Bakterien, da es die Topoisomerase II inhibiert. Daher können transformierte Zellen nur mit einem inserierten DNA-Fragment überleben. Die Insertionsstelle ist von zwei *EcoRI*-Schnittstellen flankiert, die für einen Kontrollverdau verwendet werden können. Des Weiteren liegen zur Sequenzierung der eingebrachten DNA zwei flankierende Bindestellen für die Primer M13 Reverse und M13 Forward vor. Die Selektion der Bakterien erfolgt durch ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Die Plasmidkarte ist im Anhang (vgl. Abbildung 7.4) dargestellt.

Phagemide:

Phagemide sind Vektoren, die sowohl einen bakteriellen als auch einen von filamentösen Phagen stammenden Replikationsursprung tragen, und werden zur Durchführung des Phagen-Displays (2.2.5) benötigt (Qi *et al.*, 2012).

pHEN4 (Ghassabeh *et al.*, 2010):

Das Phagemid pHEN4 (vgl. Abbildung 7.1) besitzt eine *pelB*-Sequenz zur Sekretion des VHH-pIII-Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum. Zur immunologischen Detektion des rekombinanten Proteins liegt eine HA-Tag-Sequenz vor. Als Selektionsmarker befindet sich auf dem Phagemid ein Gen für eine Ampicillinresistenz. Zwischen der HA-Tag- und der Gen III-Nukleotidsequenz befindet sich ein Amber-Stopp-Codon, welches in TG1-Bakterien unterdrückt wird und zur Fusion des Nanobodies mit dem Protein III führt (Qi *et al.*, 2012). Die Produktion des Fusionsproteins wird mit Hilfe eines *lacZ*-Promoters durch die Zugabe von IPTG induziert.

Pectate lyase B (pelB): Durch eine N-terminale *pelB*-Aminosäuresequenz werden Proteine in den periplasmatischen Raum transportiert. Dort wird die Sequenz durch eine Signalpeptidase entfernt, wodurch sich die Proteine falten und Disulfidbrücken ausbilden können (Choi und Lee, 2004).

Hämagglutinin-Tag (HA-Tag): Das HA-Tag ist eine Aminosäuresequenz des Oberflächenproteins eines menschlichen Influenzavirus (Field *et al.*, 1988) und wird C-terminal mit dem herzustellenden Protein fusioniert. Das Hämagglutinin-Tag wird als Epitop zur Detektion von rekombinanten Proteinen mit Anti-HA-Tag-Antikörpern (2.1.13) verwendet.

GenIII (gIII): Das *GenIII*-Gen codiert für das Protein III (pIII), welches M13-Phagen zur Infektion von Bakterien benötigen und das sich in fünffacher Kopie an deren apikalen Ende befindet (vgl. Abbildung 2.3). Durch eine Fusion mit einem Einzeldomänenantikörper und der Präsentation auf der Phagenoberfläche erfolgt eine Anreicherung von spezifischen VHHs während der Panningrunden. Diese Art der Selektion wird zur Reduzierung von Aviditätseffekten und zur Identifizierung von Proteinen mit einer hohen Affinität zu ihrem Zielprotein verwendet (Qi *et al.*, 2012).

pHEN6(c) (Conrath *et al.*, 2001):

Der pHEN6(c)-Vektor ist eine Variante des Phagemids pHEN4 und wird als Expressionsvektor zur Produktion von Proteinen verwendet. Die HA-Tag- und *GenIII*-Sequenz wurden entfernt, so dass sich die eingefügte VHH-Sequenz nun zwischen einer *pelB*-Sequenz und einem Polyhistidin-Tag (His-Tag) befindet. Das His-Tag dient zum einen zur Aufreinigung und zum anderen zur immunologischen Detektion (2.2.5.3) der Nanobodies. Zur Selektion liegt ein Gen für eine Ampicillinresistenz vor. Die Plasmidkarte ist im Anhang (vgl. Abbildung 7.2) dargestellt.

Icon-Plasmide (Icon Genetics, Halle):

Zur transienten Produktion von rekombinanten Proteinen in Tabakpflanzen wurde das virale Expressionssystem der Firma Icon Genetics (Halle) verwendet. Mit diesem System werden funktionale, virale Vektoren aus Pro-Vektor-Modulen in pflanzlichen Zellen assembliert. Durch Variation der 5'-Module können die Proteine in unterschiedliche Zellkompartimente transportiert werden (vgl. 2.2.3.2).

pICH10881 (Marillonnet *et al.*, 2004):

Auf dem Vektor pICH10881 befindet sich das Rekombinasemodul, welches zur Rekombination eines 5'-Moduls mit einem 3'-Modul benötigt wird. Die cDNA-Sequenz der Integrase wird von einem *arabidopsis actin 2*-Promoter und einem *nopalinsynthase*-Terminator flankiert. Damit die Rekombination der Module im pflanzlichen Zellkern stattfindet, befindet sich am 3'-Ende der Integrasesequenz eine Kernlokalisierungssequenz. Zur Selektion besitzt das Plasmid ein Gen für eine Kanamycinresistenz.

pICH17620 (Noris *et al.*, 2011):

Der Vektor pICH17620 wird als 5'-Modul verwendet, um die rekombinanten Proteine mit Hilfe einer Signalsequenz von Calreticulin in das endoplasmatische Retikulum zu transportieren. Anschließend werden die Proteine mangels eines Retentionssignales in den Apoplast sekretiert. Neben der cDNA-Sequenz einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase befindet sich auf dem 5'-Modul die cDNA-Sequenz eines viralen Transportproteins zur Verteilung assemblierter Replicons in der Pflanze. Zusätzlich zu einer *attP*-Sequenz zur Rekombination mit einem 3'-Modul besitzt das 5'-Modul noch einen *arabidopsis actin 2*-Promoter und einen *nopalinsynthase*-Terminator. Zur Selektion befindet sich auf dem Plasmid ein Gen für eine Carbenicillinresistenz.

pICH20030 (Kalthoff *et al.*, 2010):

Der Vektor pICH20030 besitzt ein 5'-Modul für den Transport der rekombinanten Proteine in Chloroplasten. Dazu liegt eine cDNA-Sequenz vor, welche für das Transitpeptid der kleinen Rubisco-Untereinheit von dikotylen Pflanzen codiert. Des Weiteren sind auf dem Modul die cDNA-Sequenzen einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase und eines viralen Transportproteins, welches assemblierte Replicons systemisch in der Pflanze verteilt. Neben eines *arabidopsis actin 2*-Promoters und eines *nopalinsynthase*-Terminators liegt noch eine *attP*-Sequenz zur Verbindung mit einem 3'-Modul vor. Zur Selektion besitzt das Plasmid ein Gen für eine Carbenicillinresistenz.

pICH10990 (Giritch *et al.*, 2006):

Der Vektor pICH10990 enthält ein 3'-Modul mit einer Polylinker-Sequenz (MCS) zur Insertion einer cDNA-Sequenz. Des Weiteren liegt am 5'-Ende des Moduls eine *attB*-Sequenz zur Rekombination mit einem 5'-Modul vor. Am 3'-Ende des Moduls befindet sich eine untranslatierte Region des Tabakmosaikvirus und ein *nopalinsynthase*-Terminator. Zur Selektion besitzt das Plasmid ein Gen für eine Carbenicillinresistenz. Die Plasmidkarte ist im Anhang dargestellt (vgl. Abbildung 7.3).

pICH7410 (Kalthoff *et al.*, 2010):

Mit dem Vektor pICH7410 wird die Funktionalität des viralen Expressionssystems überprüft. Das 3'-Modul bewirkt die Produktion eines grün fluoreszierenden Proteins. Neben der entsprechenden cDNA befinden sich auf dem Modul noch eine untranslatierte Region des Tabakmosaikvirus und ein *nopalinsynthase*-Terminator. Die *attB*-Sequenz dient zur Rekombination mit einem 5'-Modul. Zur Selektion trägt das Plasmid ein Gen für eine Carbenicillinresistenz.

2.1.13. Antikörper

Anti-HA-Tag (Kaninchen IgG)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Anti-Kaninchen-IgG-AP (Ziege IgG)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Anti-His-HRP (Maus IgG)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur exponentiellen Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewandt (Mullis *et al.*, 1986). Diese Technik wurde zum einen zur Synthese und zum anderen zur Detektion von spezifischen DNA-Sequenzen eingesetzt. Zur späteren Klonierung wurden mit Hilfe von speziellen Primern Restriktionsschnittstellen für Endonukleasen an DNA-Sequenzen angefügt. Des Weiteren wurden aber auch DNA-Sequenzen durch Mutationen oder durch andere Modifikationen unter Verwendung von entsprechenden Oligonukleotiden verändert (vgl. Tabelle 2.2). Als thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase wurde unter anderem die *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*) verwendet, die Amplifikate mit einem Desoxyadenosin als 3'-Basenüberhang generiert. Auf Grund einer zusätzlichen 3'-5'-Exonuclease-Aktivität wurde zur Synthese von DNA-Sequenzen die *Pfu*-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) eingesetzt. Diese Polymerase zeichnet sich durch ihre Korrekturlese-Funktion aus und bildet DNA-Fragmente mit glatten Enden.

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde die Zeitspanne für den Annealingschritt je nach Schmelztemperaturen (T_M -Werte) der Primer gewählt und die Elongationszeit orientierte sich an der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Nachfolgend sind ein exemplarischer PCR-Ansatz und ein standardisiertes PCR-Programm aufgeführt.

PCR-Ansatz:

10×DNA-Polymerase-Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTPs (2.5 mM)	4 µl
forward Primer (10 µM)	1 µl
reverse Primer (10 µM)	1 µl
DNA-Matrize	10-600 ng
DNA-Polymerase	1 µl (1 Unit)
H ₂ O	ad 50 µl

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	94°C	2:00	
Denaturierung	94°C	0:30	
Annealing	50°C – 65°C	0:30	30×
Elongation	72°C	1:00-3:00	
Finale Elongation	72°C	5:00	
Ende	4°C	∞	

Nested-PCR (verschachtelte PCR): Während der *Nested*-PCR wurde als DNA-Matrize ein Amplikon aus einer vorhergegangenen Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Dabei banden die beiden Primer innerhalb des Sequenzbereiches, der vorher amplifiziert wurde. Zum einen wurde so die Ausbeute erhöht, zum anderen waren die Produkte der zweiten PCR ein Indikator für die Sequenzspezifität der ersten PCR (Viljoen *et al.*, 2005).

2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurde eine Agarosekonzentration nach Größe der aufzutrennenden DNA zwischen 1-2% (w/v) verwendet. Die Agarose wurde entweder in 1×TAE- oder in 1×TBE-Puffer kurz aufgekocht und danach mit den Farbstoffen Nancy-520 (Sigma-Aldrich) oder Ethidiumbromid (AppliChem) nach Angaben der Hersteller versetzt. Vor der Auftragung in die Geltaschen wurden die DNA-Proben zur Erhöhung ihrer Dichte und zur Anfärbung der Lauffront mit 6×DNA-Ladepuffer vermischt. Nun erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 120 V für ungefähr 45 Minuten. Anschließend wurde die DNA durch Anregung der interkalierten Farbstoffe mit UV-Licht detektiert und mit Hilfe des UV-Systems von Intas (Göttingen) dokumentiert. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte durch einen Vergleich mit einem gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Leiter.

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus der Gelmatrix wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey & Nagel) oder das E.Z.N.A.® MicroElute Gel Extraction Kit (VWR International) nach Angaben der Hersteller verwendet.

<u>50×TAE-Puffer:</u>	<u>1×TBE-Puffer:</u>	<u>6×DNA-Ladepuffer:</u>
242 g/l Tris	10.8 g/l Tris	10 mM Tris-HCl, pH 7.6
54.5 g/l Eisessig	5.5 g/l Borsäure	60 mM EDTA-Na ₂
18.5 g/l EDTA-Na ₂	0.7 g/l EDTA-Na ₂	60% (w/v) Glycerol
pH 8.2 mit HCl	pH 8.0 mit HCl	0.03% (w/v) Bromphenolblau

2.2.1.3. Denaturierendes Agarosegel zur Analyse von RNA

Zur Analyse von RNA wurde eine Gelelektrophorese mit Formaldehyd durchgeführt. Dazu wurden zunächst die verwendeten Laborgeräte über Nacht in einer Glaswanne mit 3% (v/v) H₂O₂ zur Inaktivierung möglicher RNasen inkubiert. Am nächsten Tag wurden zwischen 1-2 g Agarose mit 10 ml 10×FA-Puffer und 90 ml Wasser aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden 1.8 ml 37% (v/v) Formaldehyd zur Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen (Aranda *et al.*, 2012) sowie Nancy-520 (Sigma-Aldrich) oder Ethidiumbromid (AppliChem) nach Angaben der Hersteller zur Agarose-Lösung gegeben. Anschließend wurde das Gel gegossen und für eine Stunde zum Aushärten stehen gelassen. Dann wurde das Gel mit 1×FA-Puffer überschichtet und für 10 Minuten bei 100 V equilibriert. Die Proben wurden mit 2×RNA-Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach einer Abkühlung der Proben auf Eis und der Beladung der Geltaschen wurde die Gelelektrophorese für zwei Stunden bei 80 V durchgeführt. Anschließend wurde die aufgetrennte RNA mit Hilfe des UV-Systems von Intas (Göttingen) analysiert. Die Größenbestimmung der RNA erfolgte durch einen Vergleich mit einem gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Leiter nach Angaben des Herstellers.

<u>10×FA-Puffer:</u>	<u>1×FA-Puffer:</u>
0.2 M MOPS	100 ml 10×FA-Puffer
50 mM Natriumacetat	20 ml 37% (v/v) Formaldehyd
10 mM EDTA	880 ml Wasser
pH 7.0	

2.2.1.4. Ligation und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation verbindet eine T4-DNA-Ligase kovalent die 3'-Hydroxygruppe mit der 5'-Phosphatgruppe von DNA-Sequenzen. Dabei wird eine Phosphodiesterbrücke unter ATP-Verbrauch ausgebildet. Mit Hilfe kompatibler Schnittstellen wurden auf diese Weise DNA-Sequenzen in linearisierte Plasmide inseriert. Die Ligation wurde mit einem molaren Überschuss von Insert zu Plasmid durchgeführt. Im Folgenden ist ein standardisierter Ligationsansatz aufgeführt:

Ligationsansatz:

- 7 µl Insert
- 1 µl linearisierter Vektor
- 1 µl 10×Ligations-Puffer (mit ATP)
- 1 µl T4-DNA-Ligase (4 U/µl)

Die Ligation wurde bei DNA-Fragmenten mit glatten Enden für vier Stunden bei 16°C, bei überstehenden Enden für eine Stunde bei Raumtemperatur oder jeweils über Nacht durchgeführt. Der komplette Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet (2.2.1.6, 2.2.1.10).

Wurde ein Plasmid mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten (2.2.1.16), bestand die Möglichkeit, dass die gebildeten kompatiblen Enden miteinander ligieren konnten. Um diese Religation zu verhindern, wurden die 5'- und 3'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmide mittels einer alkalischen Phosphatase abgespalten. Dazu wurde 1 µl (1 U) der FastAP-Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) zu 20 µl eines beendeten Restriktionsverdaus (2.2.1.16) gegeben und für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Dephosphorylierung durch eine fünfminütige Erhitzung auf 75°C beendet. Daraufhin wurde das geschnittene Plasmid gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus der Gelmatrix isoliert (2.2.1.2) und für eine Ligation eingesetzt.

2.2.1.5. Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung von kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien der Stämme TOP10 und DH5α wurden die Zellen mit Calcium- und Rubidiumchlorid behandelt (Hanahan, 1983). Dazu wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Platte genommen und über Nacht bei 37°C und 200 UpM in 3 ml LB-Medium inkubiert. Als nächstes wurde 1 ml der Bakteriensuspension zu 100 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C und 200 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt, 10 min auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (3000×g,

10 min, 4°C). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Bakterienpellets in 15 ml einer eiskalten Tfb1-Lösung resuspendiert und 90 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (3000×g, 10 min, 4°C) wurden die Bakterienpellets in je 4 ml eiskalter Tfb2-Lösung resuspendiert. Nun wurden die kompetenten *E. coli*-Bakterien zu je 50 µl in 1.5 ml Reagiergefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (Green und Rogers, 2013).

Tfb1-Lösung:

100 mM RbCl

50 mM MnCl₂

30 mM KOAc

10 mM CaCl₂

15% (w/v) Glycerol

pH 5.8

Tfb2-Lösung:

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl₂

15% (w/v) Glycerol

pH 6.8 (mit KOH)

2.2.1.6. Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Bakterien

Zur Generierung elektrokompenter *E. coli*-Zellen der Stämme Wk6 und TG1 wurden Bakterien aus den entsprechenden Glycerolstocks (2.2.1.17) auf LB-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Daraufhin wurde eine Starterkultur angesetzt, indem eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C und 150 UpM kultiviert wurde. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur in 300 ml 2×TY-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 bis 1.0 bei 37°C und 150 UpM angezogen. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension gleichmäßig auf sechs vorgekühlte 50 ml Röhrchen verteilt, welche eine Stunde auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation (2200×g, 4°C, 7 min) pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die pelletierten Bakterien in je 50 ml vorgekühltem 1 mM HEPES-Puffer (pH 7.0) vorsichtig resuspendiert. Nun wurden die Bakteriensuspensionen erneut zentrifugiert (2200×g, 4°C, 7 min), die Überstände entfernt und die Pellets in 25 ml vorgekühltem 10% (w/v) Glycerol vorsichtig resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2200×g, 4°C, 7 min) wurden die Überstände dekantiert und alle Pellets in einem Gesamtvolumen von 20 ml 10% (w/v) Glycerol resuspendiert. Danach fand eine Zentrifugation (2200×g, 4°C, 6 min) statt und der Überstand wurde bis auf 5 ml dekantiert. Im Anschluss an einen letzten Zentrifugationsschritt (2200×g, 4°C, 5 min) wurde der Überstand entfernt und das Bakterienpellet in 1 ml 10% (w/v) Glycerol aufgenommen. Nun wurden die elektrokompenten Zellen zu je 50 µl in 1.5 ml Reagiergefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.7. Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien per Hitzeschock

Zunächst wurden zur Transformation der *E. coli*-Bakterien 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Danach wurde entweder der komplette Ligationsansatz (2.2.1.4) oder Plasmid-DNA zu den Bakterien gegeben. Anschließend fand eine Inkubation für 20 Minuten auf Eis statt. Daraufhin wurde durch einen Hitzeschock für eine Minute bei 42°C die DNA in die Bakterienzellen eingebracht. Nach einer Inkubation von einer Minute auf Eis wurden die Bakterien in 500 µl LB-Medium gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 700 UpM auf dem Thermomixer Comfort (Eppendorf) zur Expression des Antibiotikaresistenzgens geschüttelt. Im letzten Schritt wurden die transformierten Zellen auf LB-Agar-Platten, die mit entsprechenden Antibiotika versetzt waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.1.8. Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Bakterien

Zur Transformation wurden 50 µl elektrokompente *E. coli*-Bakterien mit 1 µl eines Ligationsansatzes (2.2.1.4) gemischt und anschließend in eine vorgekühlte Elektroküvette überführt. Nach Trocknung der Aluminiumelektroden wurde die Küvette in den Gene Pulser® II (Bio-Rad) eingesetzt und eine Spannung von 2.5 kV bis zum Ertönen eines Signaltons angelegt. Dabei handelte es sich um einen elektrischen Impuls, durch den das Ligationsprodukt durch die Zellmembran in die Bakterienzelle gelangen konnte. Nachfolgend wurden zweimal hintereinander je 400 µl SOC-Medium zum Ausspülen in die Küvette gegeben, woraufhin die Bakterien in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt wurden. Damit das für eine Ampicillinresistenz verantwortliche Gen exprimiert werden konnte, wurden die Bakterien eine Stunde lang bei 37°C und 650 UpM kultiviert. Daraufhin wurden sie zur Selektion auf LB-Amp-Glu-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Des Weiteren wurden als Kontrolle 50 µl kompetente Bakterien ohne Zugabe des Ligationsansatzes transformiert.

SOB-Medium (100 ml):

Pepton	2 g
Hefeextrakt	0.5 g
2 M NaCl	0.5 ml
250 mM KCl	1 ml

SOC-Medium (25 ml):

20% (v/v) Glucose	500 µl
1 M MgSO ₄	250 µl
2 M MgCl ₂	125 µl
ad 25 ml SOB Medium	

2.2.1.9. Herstellung kompetenter Agrobakterien

Zur Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Bakterien des Stammes GV3101 wurde eine Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium mit Rifampicin und Gentamicin über Nacht bei 28°C und 200 UpM inkubiert. Als nächstes wurden 3 ml der Bakteriensuspension in 100 ml LB-Rif-Gent-Medium gegeben, bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert und anschließend auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Nach einem Zentrifugationsschritt (3000×g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und jedes Bakterienpellet in 5 ml eiskaltem TE-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (3000×g, 10 min, 4°C) wurden die Pellets in jeweils 10 ml LB-Rif-Gent-Medium resuspendiert. Abschließend wurden die Agrobakterien zu je 100 µl in 1.5 ml Reagiergefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Sollten kompetente *Agrobacterium tumefaciens*-Bakterien des Stammes LBA4404 hergestellt werden, wurden vom Protokoll abweichend YEB-Medium und die Antibiotika Rifampicin und Gentamicin verwendet.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 8.0

2.2.1.10. Transformation kompetenter Agrobakterien per Hitzeschock

Mittels Bakterien der Art *Agrobacterium tumefaciens* wurden Gene stabil in das Genom von Tabakpflanzen eingebaut. Dafür mussten zunächst Bakterien des Stammes GV3101 oder LBA4404 mit entsprechenden Plasmiden transformiert werden. Hierzu wurden 50 µl kompetente Agrobakterien bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden zu den Bakterien 5 µl Plasmid-DNA (2.2.1.12) gegeben und es erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Im nächsten Schritt wurden die Agrobakterien für fünf Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach fünf Minuten lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nachdem 500 µl LB-Medium zu den Bakterien gegeben wurde, fand eine Inkubation von zwei bis vier Stunden bei 28°C und 700 UpM auf dem Thermomixer Comfort (Eppendorf) zur Expression der Antibiotikaresistenzgene statt. Abschließend wurden die transformierten Zellen auf LB-Platten, die mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion versetzt waren, ausplattiert und für zwei bis drei Tage im Brutschrank bei 28°C inkubiert.

2.2.1.11.Colony Screening

Mittels Colony Screening wurden transformierte Bakterienkolonien durch eine PCR (2.2.1.1) identifiziert. Dafür wurden Primer zur Amplifikation einer DNA-Sequenz des Vektors verwendet. Als Erstes wurden einzelne Bakterienkolonien in je 20 µl H₂O resuspendiert. Nun wurden 10 µl der Bakteriensuspension als Matrize der Colony-PCR verwendet. Dabei wurde der folgende Reaktionsansatz eingesetzt.

Colony-PCR-Ansatz:

Bakteriensuspension	10 µl
H ₂ O	4.2 µl
10× <i>Taq</i> -Puffer	2.0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 µl
dNTPs (2.5 mM)	1.6 µl
forward Primer (10 µM)	0.2 µl
reverse Primer (10 µM)	0.2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0.2 µl
<hr/>	
Endvolumen	20 µl

Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle verwendet, bei der anstelle der Bakteriensuspension Wasser eingesetzt wurde. Daraufhin wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.2). Konnte bei Kolonien das nachzuweisende Plasmid detektiert werden, wurden die zurückbehaltenen 10 µl der Bakteriensuspension in 4 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika gegeben. Die Bakterien wurden nun entweder bei 37°C (*E. coli*) oder bei 28°C (*A. tumefaciens*) und 200 UpM über Nacht im Inkubationsschüttler Ecotron (Infors) kultiviert.

2.2.1.12.DNA-Präparation

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien wurde unter anderem mittels der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt. Dazu wurden zunächst 4 ml einer Bakterienkultur bei 37°C und 200 UpM in antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht kultiviert. Daraufhin wurden 3 ml der Übernachtskultur bei Raumtemperatur und 10000×g eine Minute lang pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Als nächstes wurden 200 µl Lösung II hinzugegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die Zellen lysiert wurden. Durch Zugabe von 200 µl gekühlter Lösung III,

anschließendem Invertieren und einer zehnminütigen Inkubation auf Eis fanden neben einer Neutralisation des pH-Werts auch eine Ausfällung von genomischer DNA und Proteinen statt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (20000×g, 5 min, RT) wurde nur mit dem klaren Überstand weitergearbeitet. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch die Zugabe von 600 µl Isopropanol und einer zweiminütigen Inkubation. Nach einer erneuten Zentrifugation (20000×g, 15 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Ethanols wurde das Pellet zehn Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in 20 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist im Folgenden aufgeführt.

<u>Lösung I:</u>	<u>Lösung II:</u>	<u>Lösung III:</u>
50 mM Glucose	1% (w/v) SDS	3 M KOAc, pH 4.8
25 mM Tris, pH 8	0.2 M NaOH	
10 mM EDTA		

Um einen hohen Reinheitsgrad der Plasmid-Lösungen zu erhalten, wurde zur Isolierung der Plasmide das E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I (VWR International) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.13.DNA- und RNA-Quantifizierung

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Lösung wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000-Spektrometers bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Probe auf die Messvorrichtung gegeben und die Konzentration anhand des Absorptionswertes mit Hilfe des Programms „NanoDrop 1000 3.7.1“ bestimmt.

2.2.1.14.DNase-Verdau zur Entfernung von DNA aus RNA-Präparationen

Zur Entfernung von genomischer DNA aus RNA-Präparationen (2.2.3.4; 2.2.6.2) wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 1 µg der isolierten RNA, 1 µl 10×Reaktionspuffer mit MgCl₂, 1 µl DNase I (1 U) und 0.5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl) mit RNase-freiem Wasser in einem Endvolumen von 10 µl vereint. Anschließend wurde ein Inkubationsschritt bei 37°C für 30 min durchgeführt. Nach der Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) erfolgte zur Inaktivierung der DNase I ein zehnminütiger Inkubationsschritt bei 65°C. Die RNA konnte nun für eine Reverse Transkription zur Analyse durch Quantitative Real-time-PCR verwendet werden (2.2.1.15; 2.2.1.19).

2.2.1.15. Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription dient zur Erststrangsynthese von cDNA aus mRNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Zur Herstellung der doppelsträngigen cDNA wird anschließend eine Polymerase-Kettenreaktion mit den cDNA-Erststrängen als Matrize und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 100 ng-5 µg Gesamt-RNA mit 2 µl eines reversen Primers in einem Volumen von 12.5 µl RNase-freiem Wasser vermengt. Bei der Verwendung von sequenzspezifischen Primern wurden 20 pmol und bei oligo(dT)₁₈-Primern (pODT201) 100 pmol der Oligonukleotide eingesetzt. Danach wurde der Ansatz zur Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen fünf Minuten lang bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 5 µl Reaktionspuffer, 0.5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl einer RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µl) mit dem Ansatz vermengt. Die Synthese des Erststranges erfolgte eine Stunde lang bei 42°C. Als nächstes wurde die Reaktion durch einen zehnminütigen Inkubationsschritt bei 70°C beendet. Zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurden 2 µl des Reaktionsansatzes als Matrize in einer PCR verwendet. Nachfolgend ist der entsprechende PCR-Ansatz aufgeführt.

PCR-Ansatz zur doppelsträngigen cDNA-Synthese:

10×DNA-Polymerase-Puffer mit MgSO ₄	5 µl
dNTPs (2.5 mM)	4 µl
forward Primer (10 µM)	1 µl
reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA-Erststrang	2 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

2.2.1.16. Restriktionsverdau

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen können DNA-Sequenzen an spezifischen Positionen geschnitten werden. Die Enzyme sind bakteriellen Ursprungs und dienen Prokaryonten zur Phagenabwehr (Roberts, 2005). Restriktionsendonukleasen des Typs II binden an bestimmte, palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren Länge und schneiden innerhalb oder in der Nähe dieser DNA-Sequenz. Dabei werden die Phosphodiesterbindungen des DNA-Rückgrats hydrolysiert, so dass entweder DNA-Fragmente mit glatten (*blunt ends*) oder überstehenden Enden (*sticky ends*)

entstehen. Die Affinität der gebildeten Schnittstellen zueinander wurde bei der Klonierung ausgenutzt, um DNA-Fragmente in Plasmide zu inserieren (2.2.1.4). Ein Restriktionsverdau erfolgte unter Verwendung spezifischer Puffer und beim Temperaturoptimum der eingesetzten Restriktionsenzyme für 1-16 Stunden. Wurde die DNA mit Hilfe der alkalischen Lyse gewonnen, (2.2.1.12) erfolgte eine Zugabe von RNase zum Restriktionsverdau. Bei einem gleichzeitigen Verdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde ein optimaler Reaktionspuffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Nachfolgend sind zwei exemplarische Reaktionsansätze aufgeführt.

Einfacher Restriktionsverdau:

0.5 – 5 µg DNA
1 µl RNase
1 µl Restriktionsenzym
1 µl 10×Reaktionspuffer
ad 10 µl H₂O

Doppelter Restriktionsverdau:

0.5 – 5 µg DNA
1 µl RNase
1 µl Restriktionsenzym 1
1 µl Restriktionsenzym 2
2 µl 10×Reaktionspuffer
ad 20 µl H₂O

2.2.1.17. Glycerolstocks

Zur dauerhaften Lagerung der Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angelegt. Dazu wurden 500 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl 50% (v/v) Glycerol vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C.

2.2.1.18. Sequenzierung und Analyse von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNA-Sequenzen wurde entweder von der Firma Seqlab (Göttingen) oder von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden die Proben nach Angaben der Unternehmen aufbereitet. Die Qualität und Aussagekraft der Sequenzierungen wurde mit Hilfe des Programms „Chromas Lite 2.01“ (Technelysium) überprüft. Die Übersetzung von DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen erfolgte durch das Programm „Vector NTI Advance® 11.5.2“ (Life Technologies) und zum multiplen Sequenzalignment wurde das Programm „ClustalW2“ (Larkin *et al.*, 2007) verwendet.

2.2.1.19. Quantitative Real-time-PCR (qPCR)

Bei der quantitativen Real-time-PCR wird mit Hilfe von fluoreszierenden Reportermolekülen die Amplifikation von DNA-Strängen während einer Polymerase-Kettenreaktion (2.2.1.1) in Echtzeit analysiert. Während der Zyklen korreliert dabei das Fluoreszenzsignal mit der Anzahl der gebildeten PCR-Produkte. Die individuellen Reaktionen werden anhand des PCR-Zyklus charakterisiert, bei dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Grenzwert (*threshold*) erreicht. Dieser Parameter wird als C_t -Wert (*threshold-cycle*) bezeichnet. Je mehr DNA als Matrize während des Starts der PCR vorliegt, desto niedriger wird auch der entsprechende C_t -Wert sein (Nolan *et al.*, 2006). Die Durchführung einer reversen Transkription mit nachfolgender quantitativer Real-time-PCR (RT-qPCR) erfolgte in zwei Schritten. Nach der Durchführung eines Fütterungsexperiments wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den Mückenköpfen isoliert (2.2.6.2). Als nächstes wurde die isolierte RNA mit DNase I behandelt, um mögliche Verunreinigungen durch genomische DNA zu beseitigen (2.2.1.14). Daraufhin wurde zur Erststrangsynthese eine reverse Transkription mit 300 ng der extrahierten und mit DNase I behandelten RNA unter Verwendung von oligo(dT)₁₈-Primern (pODT201) durchgeführt (2.2.1.15). Im zweiten Schritt wurde die generierte Erststrang-cDNA zusammen mit dem 2× SensiMix[™]-SYBR & ROX Kit (VWR International) oder mit dem iTaq[™] Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) nach Angaben der Hersteller zur Durchführung der qPCR verwendet. SYBR-Green fluoresziert nach Interkalation in doppelsträngige DNA durch Anregung mit ultraviolettem Licht und dient als Reportermolekül zur Detektion der Amplifikate (VanGuilder *et al.*, 2008), während ROX als passiver Referenzfarbstoff zur Normalisierung verwendet wird (Bustin, 2002). Die Durchführung der qPCR erfolgte mit Hilfe des StepOne[™] Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurden die Triplikate der Proben auf eine MicroAmp[®] Fast Optical 48-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Die Auswertung der Daten und die Überprüfung der Schmelzkurven erfolgte mit Hilfe des Programms „StepOne[™] Software v2.0“. Als Negativkontrolle für die qPCR wurde Wasser verwendet, welches zunächst mit DNase I behandelt (2.2.1.14) und anschließend als Matrize bei der reversen Transkription (2.2.1.15) verwendet worden war. Zur relativen Quantifizierung wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) verwendet. Dabei wurde zunächst die Expression des zu untersuchenden Gens mit Hilfe der Expression eines Haushaltsgens normalisiert. Anschließend wurde die normalisierte Expression des Zielgens mit der entsprechenden Genexpression von einer unbehandelten Kontrollgruppe kalibriert (Livak und Schmittgen, 2001).

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei werden Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse durch eine diskontinuierliche Elektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Durch die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) bilden sich unter Aufkochen der Proteinproben denaturierte SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von negativer Ladung zur Molekülmasse. Durch die Zugabe von reduzierenden Thiolen, wie z.B. β -Mercaptoethanol, können zusätzlich Disulfidbrücken gespalten werden. Die Analyse erfolgte mittels einer elektrophoretischen Auftrennung unter Verwendung von Polyacrylamidgelen. Dabei dient das Sammelgel zur Konzentration der Proteine in einer Lauffront, während das Trenngel deren Auftrennung bewirkt. Bei der Gelherstellung wird der prozentuale Anteil von Acrylamid entsprechend der Molekülmasse der zu untersuchenden Proteine angepasst. Während der Auftrennung wandern größere SDS-Protein-Komplexe langsamer durch die Polyacrylamidmatrix als kleinere Komplexe. Die Bestimmung der Proteingröße erfolgte mit Hilfe des Proteinmarkers „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers.

Nach der Herstellung des Sammel- und des Trenngels mit Hilfe des Cast-It Gelgießstandes (VWR International) wurden die Proteinproben vorbereitet. Dazu wurden 30 μ l einer Proteinlösung mit 7.5 μ l 5 \times SDS-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten lang bei 95°C erhitzt. Von dieser Probe wurden nun bis zu 25 μ l in eine Geltasche des Sammelgels gegeben. Bei der Untersuchung von Pflanzenmaterial wurden 100 mg Blattgewebe mit Hilfe von flüssigem N₂ zerkleinert und nach der Zugabe von 300 μ l 2 \times SDS-Probenpuffer für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Anschließend wurde die Pflanzenprobe zentrifugiert (20000 \times g, 5 min, RT) und bis zu 25 μ l des Überstands wurden zur Analyse verwendet. Zur Untersuchung von Proteinen aus Bakterien wurden zunächst 500 μ l einer Zellkultur zentrifugiert (10000 \times g, 10 min, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Nun wurden von der Probe ebenfalls bis zu 25 μ l zur Untersuchung eingesetzt. Die Elektrophorese wurde für eine Stunde bei 40 V und anschließend zur Auftrennung der Proteine für zwei Stunden bei 110 V durchgeführt.

13% Trenngel:

2.38 ml Acrylamid-Lösung (30%)
1.4 ml Trenngelpuffer
56.5 µl 10% (w/v) SDS-Lösung
1.6 ml H₂O
28.3 µl 10% (w/v) APS-Lösung
25 µl TEMED

4% Sammelgel:

0.44 ml Acrylamid-Lösung (30%)
0.83 ml Sammelgelpuffer
33 µl 10% (w/v) SDS-Lösung
2 ml H₂O
25 µl 10% (w/v) APS-Lösung
25 µl TEMED

Trenngelpuffer:

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Sammelgelpuffer:

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Laufpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
0.1% (w/v) SDS

SDS-Probenpuffer:

2% (w/v) Natriumdodecylsulfat
0.1% (w/v) Bromphenolblau
10% (v/v) Glycerol
50 mM Tris-HCl, pH 6.8
5% (v/v) β-Mercaptoethanol (optional)

2.2.2.2. Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteine (2.2.2.1) wurde Coomassie Brilliant Blau G-250 verwendet, das sich auf Grund von hydrophoben Effekten und durch elektrostatische Interaktion mit basischen Aminosäuren an Proteine anlagert (Tal *et al.*, 1985). Als erstes wurde das Trenngel für 20 Minuten bei 100°UpM in 200 ml Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser kurz gewaschen. Nun wurde das angefärbte Trenngel in 200 ml Entfärbelösung 20 Minuten lang bei 100°UpM geschüttelt. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde das Gel mit Hilfe der Entfärbelösung weitere 30 Minuten entfärbt.

Coomassie-Färbelösung:

0.5% (v/v) Coomassie Brilliant Blau G-250
50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

60% (v/v) H₂O
30% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure

2.2.2.3. Detektion von Proteinen mittels Western Blot

Der Western Blot dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe eines immunologischen Verfahrens, indem Proteine auf eine Membran übertragen und anschließend mit Antikörpern detektiert werden (Towbin *et al.*, 1979): Dazu wurde im Anschluss an eine SDS-PAGE (2.2.2.1) das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen zehn Minuten lang in Transferpuffer equilibriert. Als nächstes wurde eine PVDF-Membran kurz in Methanol inkubiert und anschließend ebenfalls in Transferpuffer gegeben. Der Zusammenbau der Blot-Apparatur (VWR International) erfolgte unter Luftabschluss im Transferpuffer. Dazu wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge übereinander geschichtet: Schaumstoff, Whatmanpapier, Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, Whatmanpapier, Schaumstoff. Anschließend wurde eine Spannung von 100 V für eine Stunde angelegt, so dass die Proteine auf Grund ihrer negativen Ladung (2.2.2.1) elektrophoretisch auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Nun wurden die unbesetzten Stellen der PVDF-Membran über Nacht mit Hilfe einer Blockierungslösung (5% (w/v) Magermilchpulver in PBST) bei 4°C blockiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit einem primären Antikörper, welcher nach Angaben des Herstellers in 10 ml PBST verdünnt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die ungebundenen Immunglobuline durch drei zehnminütige Waschschriffe mit PBST entfernt. Als nächstes erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper, der nach Angaben des Herstellers in 10 ml PBST verdünnt wurde. Der sekundäre Antikörper war mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert und band an den Fc-Teil des primären Antikörpers. Durch Zugabe eines Substrates und auf Grund der Peroxidaseaktivität konnte so das Zielprotein nachgewiesen werden. Nun erfolgte ein dreimaliger Waschschriff von je 10 Minuten Dauer. Daraufhin wurde die Membran in Frischhaltefolie gelegt, ein Gemisch des „CheLuminate-HRP PicoDetect“-Kits nach Angaben des Herstellers hinzugeben und für fünf Minuten inkubiert. Schließlich wurde eine halbe Minute bis zu einer Stunde lang ein Röntgenfilm auf die Membran unter Rotlicht gelegt. Zum Schluss wurde der Röntgenfilm zur Entwicklung erst in eine Entwicklerlösung, danach in Wasser und schließlich in eine Fixiererlösung gegeben.

Transferpuffer:

3.02 g/l Tris
14.4 g/l Glycin
20% (v/v) Methanol

2.2.2.4. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Mit Hilfe eines *Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)* können durch Verwendung von Antikörpern Antigene spezifisch nachgewiesen oder quantifiziert werden. Bei einem indirekten ELISA wird zunächst ein Antigen an eine Kavität einer Mikrotiterplatte gebunden. Durch die Zugabe einer Blockierungslösung werden anschließend Bereiche der Vertiefung ohne gebundene Antigene bedeckt. Damit soll verhindert werden, dass Antikörper ebenfalls an die Mikrotiterplatte binden und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Als nächstes wird ein primärer Antikörper, welcher spezifisch an das Antigen bindet, in die Kavität gegeben. Nach Inkubation und einem Waschvorgang zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern werden polyklonale, sekundäre Antikörper hinzugefügt, die eine Affinität an den Fc-Teil des ersten Antikörpers aufweisen. Diese sekundären Antikörper sind mit einem Enzym fusioniert, welches nach der Zugabe eines Substrates für einen Farbumschlag sorgt. Nach einem weiteren Inkubations- und Waschschrift wird durch eine Untersuchung mit einem Spektrometer die Absorption des umgesetzten Farbstoffes gemessen. Je höher der dabei gemessene Wert ausfällt, desto mehr primäre Antikörper und damit Antigene sind in der Kavität vorhanden (Gan und Patel, 2013). In dieser Arbeit wurde das Prinzip des ELISAs zur Charakterisierung der Bindungsaffinitäten von Einzeldomänenantikörpern (2.2.2.5) und Nanobody-Fusionsproteinen (2.2.3.2) verwendet, welche äquivalent zu den primären Antikörpern eingesetzt wurden.

Dazu wurden drei Kavitäten einer ELISA-Platte (Immuno Plate F96 Maxisorp, Nunc) mit je 100 µl einer Faktor H-Lösung (0.1 µg in PBS (pH 7.4)) als auch drei Kavitäten mit PBS (pH 7.4) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Vertiefungen entleert und zur Entfernung von ungebundenen Immunglobulinen dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden in jede Kavität 200 µl einer Blockierungslösung (2% Magermilchpulver in PBS (pH 7.4)) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden die Vertiefungen dreimal mit PBST gewaschen. Nun wurden in jede der Kavitäten 100 µl einer verdünnten Immunglobulin-Lösung gegeben. Daraufhin wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert, fünfmal mit PBST gewaschen und in jede Kavität 100 µl einer 1:2000 Verdünnung eines monoklonalen Antikörpers (0.2 µg/ml) gegeben. Dieser Antikörper band spezifisch an ein His-Tag und war mit einer Meerrettichperoxidase fusioniert (2.1.13). Nach einem einstündigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur erfolgten fünf Waschschriffe mit PBST. Anschließend wurden in jede Vertiefung 100 µl einer 1-Step Turbo TMB-ELISA Lösung (Thermo Fisher Scientific) gegeben, welche zuvor auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Nach einem Inkubationsschritt von 17 Minuten bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von je 100 µl einer 1 M Schwefelsäure die enzymatische Reaktion beendet. Nun wurde die Absorption des umgesetzten Produktes mit dem Microplate Reader INFINITE® M200 (Tecan) bei 450 nm gemessen.

Zur Überprüfung des Bindungsverhaltens des sekundären Antikörpers wurden 100 µl PBS anstelle der Immunglobulin-Lösung eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurden anstelle der Immunglobulin- und Antikörperlösungen jeweils 100 µl PBS verwendet.

2.2.2.5. Produktion von rekombinanten Proteinen mittels IPTG-Induktion

Zur Produktion von Nanobodies wurden WK6-Zellen verwendet, welche mit einem pHEN6(c)-Vektor und der inserierten VHH-Sequenz transformiert wurden (2.2.1.4). Als erstes wurde eine höchstens zwei Wochen alte WK6-Einzelkolonie von einer LB-Amp-Glu-Platte genommen und über Nacht in 15 ml LB-Amp Medium bei 37°C und 130 UpM kultiviert. Am nächsten Tag wurden 10 ml dieser Starterkultur zu 330 ml TB-Medium gegeben, welches mit einer Ampicillin- (100 µg/ml Endkonzentration), einer Glucose- (1% (w/v) Endkonzentration) und einer MgCl₂-Lösung (2 mM Endkonzentration) unter sterilen Bedingungen versetzt wurde. Das Wachstum der *E. coli*-Zellen erfolgte bei 37°C und 130 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bis 0.9, um dann mittels Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) die Genexpression zu induzieren. Die Produktion der Nanobodies erfolgte bei 28°C und 130 UpM über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet, indem 330 ml der Bakteriensuspension zehn Minuten lang bei 3500×g und 14°C pelletiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellyse erfolgte durch osmotischen Schock. Dazu wurde das Pellet in 4 ml TES-Lösung resuspendiert und zwei Stunden lang auf Eis bei 200 UpM geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 8 ml einer 1:4 mit Wasser verdünnten TES-Lösung und durch eine zweistündige Inkubation auf Eis schüttelnd bei 200 UpM lysiert. Nach Zugabe von 100 µl einer 2 M MgCl₂-Lösung wurden die zerstörten Zellen für 30 Minuten bei 3500×g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, in dem sich auch die produzierten Nanobodies befanden, abgenommen und bei -20°C gelagert. Als Kontrolle wurden WK6-Zellen verwendet, die mit einem pHEN6(c)-Vektor ohne Insert transformiert wurden. Zur Aufreinigung von Nanobodies durch Affinitätschromatographie (2.2.2.6) wurde der Überstand der lysierten und zentrifugierten Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Bevor die löslichen Gesamtproteine auf das Säulenmaterial gegeben wurden, erfolgte ein Zentrifugationsschritt (3500×g, 4°C, 10 min), um präzipitierte Proteine zu pelletieren und anschließend zu entfernen.

2.2.2.6. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen durch Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen erfolgte durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Protino[®] Ni-TED Resins (Macherey-Nagel). Dabei wurde Granulat eingesetzt,

welches auf Siliciumdioxid basiert und mit geladenen Ni^{2+} -Kationen versehen ist. Die Bindung von rekombinanten Proteinen erfolgt durch die Interaktion eines His-Tags mit den immobilisierten Metallionen. Die chelatisierende Gruppe Tris-Carboxymethyl-Ethylen-Diamin (TED) besetzt fünf der sechs Bindungsstellen eines Ni^{2+} -Kations, so dass Proteine mit einem His-Tag an die unbesetzte Bindungsstelle binden können. In eine Säule wurden 1.4 g Säulenmaterial gegeben und nach den Angaben des Herstellers mit einer Fritte abgedichtet. Anschließend wurde eine Äquilibration durchgeführt, indem 12 ml LEW-Puffer über die Säule gegeben wurden. Der klare Überstand mit den löslichen Proteinen aus Bakterien (2.2.2.5) oder pflanzlichen Zellen (2.2.3.6) wurde dann dreimal hintereinander über die Säule gegeben, damit die rekombinanten Proteine mit ihrem His-Tag an die Ni^{2+} -Kationen binden konnten. Daraufhin wurden zwei Waschschrte mit je 12 ml LEW-Puffer durchgeführt, um ungebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine durch die Verwendung von 9 ml Elutionslösung eluiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Dabei konkurrierte das im Überschuss vorhandene Imidazol mit dem His-Tags der Einzeldomänenantikörper um die Bindungsstellen der Ni^{2+} -Kationen, so dass sich die gebundenen Nanobodies von dem Granulat lösten (Terpe, 2003). Die Elutionen wurden bei 4°C gelagert. Das Ergebnis der Aufreinigung wurde durch eine SDS-PAGE (2.2.2.1) überprüft.

LEW-Puffer:

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

pH 8.0

Elutionslösung:

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8.0

2.2.2.7. Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen

Die mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten (2.2.2.6) rekombinanten Proteine wurden durch Verwendung von „Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 10K Devices“ (Merck-Millipore) sowohl in einen anderen Puffer überführt als auch konzentriert. Des Weiteren wurde dadurch auch das Imidazol aus der Lösung entfernt. Zunächst wurden die Elution, bei der rekombinante Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.2.2.1) nachgewiesen worden waren, in ein Device geben und bei 4500×g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden zur Umpufferung zweimal nacheinander 12 ml PBS (pH 7.4) in das Röhrchen gegeben, um daraufhin jeweils einen Zentrifugationsschritt (4500×g, 30 min, RT) durchzuführen. Bei diesem Prozess wurden ungefähr

500 µl einer Lösung mit rekombinanten Proteinen erhalten, die zu je 100 µl in Reagiergefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert wurden.

2.2.2.8. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung einer Proteinkonzentration wurde zum einen mit Hilfe des NanoDrop ND-1000-Spektrometers und zum anderen durch einen Bradford-Test durchgeführt. Bei der spektrometrischen Bestimmung wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin Licht und eignen sich so zur Determination der Proteinkonzentration (Pace *et al.*, 1995). Dabei wurde für jedes Protein der jeweilige Extinktionskoeffizient ϵ (vgl. Tabelle 3.10) verwendet und die Konzentration mit Hilfe des Programms „NanoDrop 1000 3.7.1“ bestimmt.

Beim Bradford-Test wird die Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 mit bestimmten Aminosäureresten von Proteinen ausgenutzt. Bei diesem Vorgang verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blau G-250 von 465 nm zu 595 nm (Bradford, 1970). Dabei wurde die Bradford-Lösung (AppliChem) nach Angaben der „Alternate Assay III“-Anleitung des Herstellers verwendet. Abweichend zum Protokoll wurde BSA zur Kalibrierung in PBS gelöst. Des Weiteren fand die Inkubation mit der Bradford-Lösung 15 Minuten statt. Die Messung erfolgte mit dem „Microplate Reader INFINITE® M200“ (Tecan) in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Corning Inc.).

2.2.2.9. Bio-Layer-Interferometrie

Die Bio-Layer-Interferometrie ist eine markierungsfreie, optisch-analytische Technik, um durch Messung der Interferenzmuster von Lichtwellen biomolekulare Interaktionen zwischen Proteinen zu untersuchen. Dabei wird weißes Licht in einem optischen Biosensor zu einer internen Referenzschicht und zur apikalen Oberfläche des Sensors geleitet. Lichtstrahlen werden von beiden Schichten reflektiert und interferieren mit konstruktiven und destruktiven Effekten. Das entstehende Interferenzmuster wird dann durch einen Detektor gemessen. Die Spitze des Biosensors kann mit Proteinen beladen werden, wodurch die Schichtdicke zunimmt. Wenn die gebundenen Proteine nun mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten, erhöht sich abermals die Schichtdicke. Dadurch verändert sich das Interferenzmuster und die kinetischen Daten der Protein-Protein-Interaktion können in Echtzeit berechnet werden (Wilson *et al.*, 2010). Durch diese Methode wurden die kinetischen Konstanten der biomolekularen Interaktion von Anti-Faktor H-Nanobodies und Faktor H mit Hilfe des Octet RED Systems (FortéBio) bestimmt.

Zur Immobilisierung der Nanobodies wurden Ni-NTA-Biosensoren verwendet. Diese Biosensoren können auf Grund von gebundenen Ni^{2+} -Ionen mit Proteinen beladen werden, die ein Hexahistidin-Tag besitzen. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden die Programme „Octet Data Acquisition 7.1.0.84“ und „Forte Bio Analysis 7.1“ verwendet. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde ein Kinetik-Puffer (0.02% (w/v) BSA, 0.01% (v/v) Tween 20, PBS (pH 7.4)) eingesetzt. Zur Überprüfung der Spezifität gegen Faktor H wurde als Referenz ein Ni-NTA-Biosensor mit den Einzeldomänenantikörpern beladen und im Assoziations- und Dissoziationsschritt in Kinetik-Puffer mit Interleukin-8 (100 nM) inkubiert. Zur Affinitätskontrolle von Faktor H hinsichtlich der Biosensoren wurde ein unbeladener Sensor im Assoziationsschritt mit einer 50 nM-Lösung des Antigens inkubiert. Während der Versuche wurden schwarze Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und flachen Böden aus Polypropylen (Greiner Bio-One) eingesetzt. Die Messungen wurden bei 37°C und 1000 UpM durchgeführt.

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration bei der Beladung der Ni-NTA-Biosensoren wurde ein entsprechender Vorversuch durchgeführt. Dazu wurden die Biosensoren zur Hydratation mindestens 10 Minuten in Kinetik-Puffer inkubiert. Danach erfolgten die Beladungen der Biosensoren mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu charakterisierenden Nanobodies (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml). Anschließend wurden im Assoziationsschritt je 100 nM Faktor H eingesetzt. Aufgrund der erhaltenen Informationen wurde nun die Bestimmung der kinetischen Konstanten von den Nanobodies durchgeführt. Als erstes wurden die Biosensoren zur Hydratation 10 Minuten in Kinetik-Puffer inkubiert. Die Dauer der Programmschritte ist in nachfolgender Tabelle zusammengefasst. In jeder Kavität wurde mit einem Volumen von 200 µl gearbeitet.

Tabelle 2.3 Programm zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der Nanobodies.

Schritt	Lösung	Zeit [s]	UpM
Beladung	Kinetik-Puffer + Ligand	60	1000
Basislinie	Kinetik-Puffer	3000	1000
Assoziation	Kinetik-Puffer + Analyt	900	1000
Dissoziation	Kinetik-Puffer	900	1000

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde mit Hilfe der Programmeinstellung „*global fitting*“ mit Berücksichtigung der Referenz durchgeführt. Dabei wurde ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 angenommen.

2.2.3. Methoden zur Arbeit mit Pflanzen

2.2.3.1. Stabile Transformation von *Nicotiana tabacum* ‘Petit Havana‘

Zur stabilen Transformation von *Nicotiana tabacum* ‘Petit Havana‘ wurden genetisch modifizierte Bakterien der Art *Agrobacterium tumefaciens* verwendet. Das pflanzenpathogene Bodenbakterium inseriert mit Hilfe von vir-Proteinen eine spezifische DNA-Sequenz eines Ti-Plasmids (*tumor inducing plasmid*) in das pflanzliche Kerngenom. Diese Transfer-DNA (T-DNA) enthält bei dem Wildtyp-Bakterium sowohl Gene für den Opin-Katabolismus als auch Onkogene. Durch die pflanzliche Expression der eingebrachten Gene werden Tumorwachstum und die Synthese von Opinen induziert. Die Agrobakterien verwenden die entstandenen Gallen als Lebensraum und die organischen Verbindungen als Stickstoffquelle (Citovsky und Tzfira, 2006). Zur genetischen Veränderung von Pflanzen werden in der Grünen Biotechnologie rekombinante Agrobakterienstämme mit einem binären Vektorsystem eingesetzt. Dabei wurde einem modifizierten Ti-Plasmid die T-DNA-Region entfernt, während die *vir*-Gene für den Transport der Transfer-DNA in den Zellkern der Pflanzenzelle beibehalten wurden. Auf einem zweiten Vektor befindet sich der von einer LB (*left border*)- und einer RB (*right border*)-Sequenz flankierte DNA-Bereich, welcher in das Pflanzengenom eingebaut wird (Komori *et al.*, 2007).

Die Transformation der Tabakpflanzen wurde entweder mit den Agrobakterienstämmen GV3101 oder LBA4404 durchgeführt. Zunächst wurden die Bakterien in 100 ml LB-Medium, welches mit entsprechenden Antibiotika versetzt war, zur Inkubation über Nacht bei 28°C und 200 UpM gegeben. Nun wurden 15 ml der Bakteriensuspension pelletiert (4000×g, 4 min, RT) und nach Dekantieren des Überstandes in 25 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5-1 resuspendiert. Durch Zugabe von 50 µl Silwet 77 wurde die Oberflächenspannung der Suspension zur besseren Benetzung der Tabakblätter reduziert. Danach wurden unter sterilen Bedingungen zwei bis sechs Wochen alte Tabakblätter mit einem Skalpell in ungefähr 30 mm² große Stücke zerteilt. Die Blattstücke wurden zehn Minuten in der Agrobakteriensuspension inkubiert und anschließend durch die Verwendung von Filterpapier getrocknet. Im Anschluss wurden die Blattstücke mit der Unterseite nach oben auf RMOP-Platten gesetzt und für zwei Tage bei 20°C in Dunkelheit aufbewahrt. Als nächstes wurden die Stücke mit derselben Orientierung auf RMOP-Platten gegeben, welche zur Selektion mit Kanamycin (50 µg/ml) und Timentin (100 µg/ml) versetzt waren, und bei 26°C unter Dauerlicht kultiviert. Zur Ausdifferenzierung der Tabakpflanzen wurden Kalli auf MS-Medium überführt, welches ebenfalls die zuvor eingesetzten Antibiotika enthielt, und bei 26°C unter Dauerlicht wachsen gelassen. Nach einer

Wurzelbildung wurde DNA aus Blattmaterial isoliert (2.2.3.4), um mittels PCR (2.2.1.1) eine Überprüfung auf Transgenität durchzuführen. Die Pflanzen wurden bei einer Wuchshöhe von ungefähr 10 cm in Erde gesetzt und bis zur Ausbildung ihrer Cuticula mit einer Plastikhaube überdeckt. Die Kultivierung der Tabakpflanzen fand im Otto-Stocker-Gewächshaus der TU-Darmstadt bei ungefähr 23 C, einer Luftfeuchtigkeit von ca. 60% und 16 Stunden Beleuchtungszeit statt. Geerntete Tabaksamen wurden bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

2.2.3.2. Transiente Produktion von rekombinanten Proteinen in *Nicotiana benthamiana*

Zur Produktion von rekombinanten Proteinen in Tabakpflanzen wurde ein virales Expressionssystem der Firma Icon Genetics (Halle) verwendet, welches auf dem Replikationsmechanismus des Tabakmosaikvirus (TMV) basiert. Mit diesem System werden funktionale, virale Vektoren aus verschiedenen Pro-Vektor-Modulen in Pflanzenzellen assembliert. Die Module werden mittels Agrobakterien in die Zelle transportiert, im Nucleus durch eine Integrase zusammengefügt und anschließend transkribiert. Durch Spleißen werden ungewünschte Elemente entfernt, so dass ein voll funktionsfähiges RNA-Replicon in das Cytosol exportiert wird (Marillonnet, *et al.* 2004). Der assemblierte Vektor wird mit Hilfe eines viralen Transportproteins (MP) durch die Plasmodesmata systemisch in der Pflanze verteilt (Sambade *et al.*, 2008). Dieser Ablauf ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt.

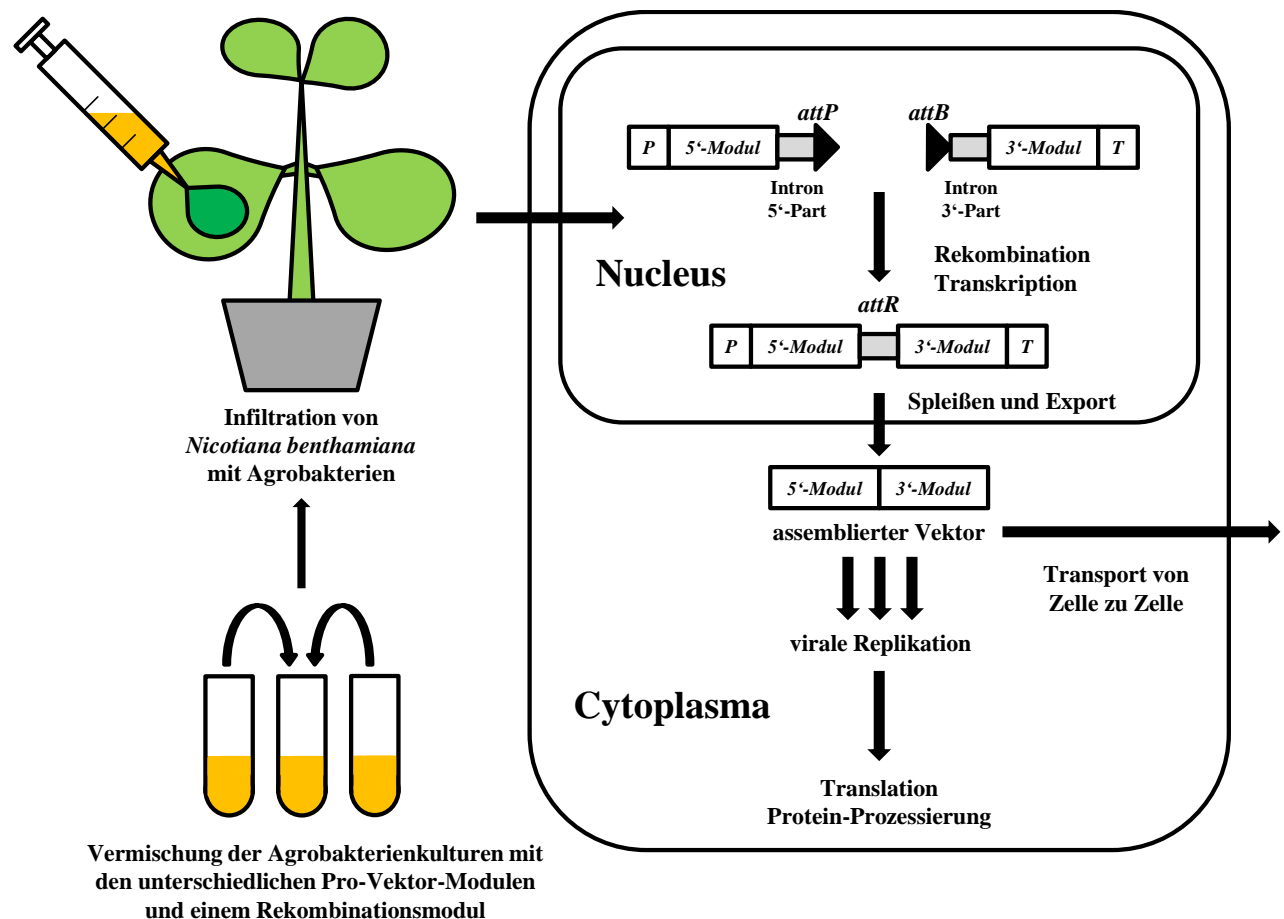


Abbildung 2.1 Schematische Übersicht der Assemblierung von den Pro-Vektor-Modulen in *Nicotiana benthamiana* (in Anlehnung an Marillonnet *et al.*, 2004). *P*: *arabidopsis actin 2*-Promoter (ACT2). *T*: *nopalinsynthase* Terminator (NOS). *attP*, *attB*: Attachment-Sequenzen, durch die das 5'- und das 3'-Modul durch eine Integrase zusammengefügt werden. *attR*: Durch Rekombination entstandene Verbindungssequenz zwischen dem 5'- und dem 3'-Modul.

Zur transienten Genexpression werden drei Agrobakterienkulturen im gleichen Verhältnis zueinander vermischt. Die Bakterien jeder Kultur besitzen einen Vektor mit einer T-DNA-Sequenz, die entweder für ein 5'-Modul, ein 3'-Modul oder ein Rekombinationsmodul codiert. Nachdem die Bakterien mit Hilfe von Spritzen oder unter Vakuum in das Blattgewebe infiltriert wurden, erfolgt der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer, so dass in den Pflanzenzellen die Assemblierung der viralen Replicons beginnt. Zur Produktion eines rekombinanten Proteins wurde zunächst die gewünschte cDNA-Sequenz in das 3'-Modul pICH10990 kloniert. Durch die Verwendung von unterschiedlichen 5'-Modulen wird das Protein entweder in Chloroplasten (pICH20030) oder in den Apoplast (pICH17620) transportiert. Die sequenzspezifische Rekombination der beiden Module findet im Zellkern durch die Integrase statt. Eine Übersicht über die unterschiedlichen T-DNA-Regionen der Icon-Plasmide ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

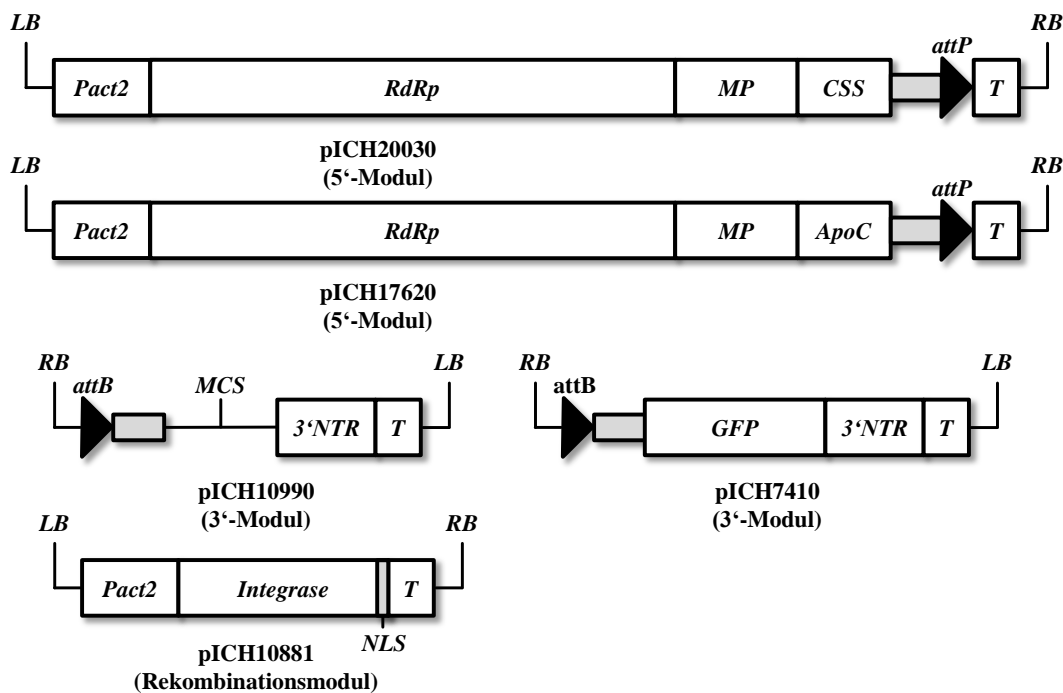


Abbildung 2.2 Übersicht über die verschiedenen Module des viralen Expressionssystems (in Anlehnung an Marillonnet *et al.*, 2004; Kalthoff *et al.*, 2010; Giritch *et al.*, 2006; Noris *et al.*, 2011). *Pact2*: *arabidopsis actin 2*-Promoter. *T*: *nopalinsynthase* Terminator. *RdRp*: RNA-abhängige RNA-Polymerase. *MP*: Movementprotein zur systemischen Verteilung der Replicons. *MCS*: *Multiple Cloning Site*. *3'NTR*: untranslatierte Region des TMVs. *Integrase*: sequenzspezifische Integrase *phC31*. *GFP*: grün fluoreszierendes Protein. *NLS*: Kernlokalisierungssignal. Die produzierte Integrase wird durch das Kernlokalisierungssignal in den Nucleus transportiert. *attP*, *attB*: Attachment-Sequenzen zur Verbindung der 5'- und 3'-Module durch die Integrase. *CSS*: Chloroplasten-Signalsequenz. Die Signalsequenz der kleinen Rubisco-Untereinheit von dikotylen Pflanzen bewirkt den Transport der rekombinanten Proteine in den Chloroplasten. *ApoC*: ER-Signalsequenz von Calreticulin. Durch die Signalsequenz werden die rekombinanten Proteine in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Danach werden die Proteine mangels eines Retentionssignales in den Apoplast sekretiert.

Zur transienten Genexpression in *Nicotiana benthamiana* wurden Übernachtskulturen mit Agrobakterien des Stammes GV3101 angesetzt, die entweder ein Plasmid mit einem 5'-Modul, einem 3'-Modul oder mit dem Rekombinasemodul durch eine Transformation aufgenommen hatten. Dazu wurde je eine entsprechende Einzelkolonie von einer LB-Selektionsplatte genommen und in 5 ml LB-Medium überführt, welches zuvor mit entsprechenden Antibiotika versetzt worden war. Nach einer Kultivierung bei 28°C und 700 UpM über Nacht wurden die Bakterien am nächsten Tag durch eine Zentrifugation (8000×g, 5 min, RT) pelletiert und anschließend in je 25 ml ICON-Puffer resuspendiert. Danach wurden jeweils drei Agrobaktériensuspensionen im Verhältnis 1:1:1 vermischt, so dass nach der Transformation der Pflanze durch die Rekombination des 5'- und des 3'-Moduls ein funktionales Replikon gebildet wurde. Nun wurden vier bis sechs Wochen alte Tabakpflanzen eine Stunde vor der

Infiltration gewässert, damit sich die Stomata öffneten. Des Weiteren wurden den Pflanzen Blüten und alte Blätter entfernt. Als nächstes wurde die vermischte Agrobakteriensuspension mit einer Tuberkulinspritze durch die Spaltöffnungen in das Gewebe der Blätter injiziert. Zur Kontrolle der Genexpression wurde eine Tabakpflanze mit den Konstrukten pICH7410, pICH10881 und pICH20030 oder pICH17620 (vgl. Abbildung 2.2) transformiert. Dadurch produzierte die Pflanze das grün fluoreszierende Protein, so dass durch Bestrahlung mit UV-Licht die Akkumulation des rekombinanten Proteins überprüft werden konnte. Die transformierten Tabakpflanzen wurden bei 22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einer Beleuchtungsdauer von 12 Stunden kultiviert. Ausgehend von der Fluoreszenzintensität der Kontrollpflanze wurde das Blattmaterial der infiltrierten Pflanzen nach 5-12 Tagen geerntet, durch Verwendung von flüssigem Stickstoff pulverisiert und bei -20°C gelagert. Um Tabakpflanzen mit Hilfe von Vakuum zu infiltrieren, wurden folgende Veränderungen zu dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt: Als erstes wurden 5 ml der unterschiedlichen Agrobakterienkulturen angesetzt. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Starterkultur in 100 ml LB-Medium überführt, welches mit den entsprechenden Antibiotika versetzt worden war, und über Nacht bei 28°C und 700 UpM inkubiert. Nachdem die Bakterienkulturen durch Zentrifugieren (8000×g, 5 min, RT) pelletiert wurden, erfolge eine Resuspension der Pellets in jeweils 50 ml Icon-Puffer. Anschließend wurden jeweils drei Agrobakteriensuspensionen in ein Becherglas überführt und das Volumen wurde mit Icon-Puffer auf einen Liter aufgefüllt. Nun wurde eine Tabakpflanze mit dem oberirdischen Teil in das Gefäß gegeben. Nachdem eine Plastikglocke luftdicht über der Pflanze platziert wurde, erfolgte das Anlegen eines Unterdrucks von 0.6 bis 0.8 bar. Durch einen langsamen Druckausgleich drang die Bakteriensuspension nun durch die Stomata in die Blätter ein, so dass die transiente Produktion des rekombinanten Proteins initiiert wurde (Marillonnet, *et al.* 2005).

Icon-Puffer:

10 mM MES

10 mM MgSO₄

2.2.3.3. Oberflächensterilisation von Tabaksamen

Zur sterilen Anzucht von Tabakpflanzen wurden vor der Aussaat die Oberflächen der Samen sterilisiert. Dafür wurden ungefähr 100 µl Tabaksamen in ein 1.5 ml Reagiergefäß gegeben und für 20 Minuten unter mehrmaligen Invertieren in 1 ml Sterilisationslösung inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Samen unter sterilen Bedingungen fünfmal mit H₂O gewaschen und im

Anschluss auf MS-Medium gegeben, welches bei der Aussaat von transgenen Samen zusätzlich mit den entsprechenden Antibiotika versetzt worden war.

Sterilisationslösung:

6.25% (v/v) Natriumhypochlorit

0.5% (v/v) Tween 20

2.2.3.4. DNA-Extraktion aus Tabakpflanzen (CTAB-Methode)

Zur DNA-Isolierung aus Tabakpflanzen wurden 100 mg Blattmaterial in ein 2 ml Reagiergefäß gegeben, durch flüssigen Stickstoff gefroren und mit einem Pistill zerkleinert. Anschließend wurden 14 µl β-Mercaptoethanol in 10 ml vorgewärmten Extraktionspuffer gegeben und davon nachfolgend 750 µl in das Reagiergefäß überführt. Nach der Zugabe von 750 µl Chloroform wurde der Ansatz gemischt und eine Stunde im Wärmebad bei 65°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (7500×g, 10 min, 4°C) wurde die wässrige Phase in ein neues Reagiergefäß überführt und zur DNA-Fällung mit einem gleichen Volumenanteil von 100% Isopropanol vermischt. Nach einer erneuten Zentrifugation (10000×g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit 750 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

Extraktionspuffer:

1% (w/v) N-Lauroylsarcosin Natriumsalz

0.8 M NaCl

0.022 M EDTA

0.22 Tris-HCl (pH 7.8)

0.8% CTAB

0.14 M D-Mannitol

2.2.3.5. RNA-Extraktion aus Tabakpflanzen

Zur Analyse der pflanzlichen RNA wurden zunächst 100 mg Blattmaterial von Tabakpflanzen unter flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit 1 ml peqGOLD Trifast[™] (VWR International) vermischt. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde ein

Zentrifugationsschritt (10 min, 12000×g, 4°C) durchgeführt. Nachfolgend wurde der Überstand in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt, mit 200 µl Chloroform vermischt und der Ansatz daraufhin 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Im Anschluss wurde ein Inkubationsschritt von zehn Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde zur Bildung von drei Phasen zentrifugiert (12000×g, 5 min, 4°C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol vermischt und für fünfzehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 12000×g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol durch Mischen und Zentrifugieren (12000×g, 10 min, 4°C) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser während eines zehnminütigen Inkubationsschritts bei 60°C gelöst. Die Lagerung der isolierten RNA fand bei -80°C statt.

Zur Extraktion von RNA zur Verwendung in Fütterungsexperimenten mit weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken wurden zuerst 2 g Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff gemörsernt und mit 20 ml peqGOLD TrifastTM (VWR International) vermengt. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten lang in einem Ultraschallbad homogenisiert. Nach einer anschließenden Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden zum Ansatz 4 ml Chloroform gegeben und kräftig gemischt. Als nächstes wurde ein Zentrifugationsschritt (15 min, 8000×g, 4°C) durchgeführt und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Danach erfolgte die Aufreinigung der RNA mit Hilfe RNA Clean & ConcentratorTM-100-Kits (Zymo Research Corp.) nach Angaben des Herstellers. Anschließend erfolgte die Lagerung der extrahierten RNA bei -80°C.

2.2.3.6. Protein-Extraktion aus Tabakpflanzen

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus Tabakpflanzen wurde zunächst 10 g frisches Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Anschließend wurde das Blattpulver in 100 ml Extraktionspuffer überführt und zehn Minuten auf Eis gerührt. Der Puffer beinhaltete Natriumascorbat als Antioxidationsmittel und den Serinprotease-Inhibitor AEBSF. Um das Blattmaterial aus dem Ansatz zu entfernen, wurde eine Filtration durch zwei Lagen Miracloth durchgeführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (4300×g, 10 min, 4°C) wurde der klare Überstand, in dem sich die extrahierten wasserlöslichen Proteine befanden, zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie verwendet (2.2.2.6).

Extraktionspuffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Natriumascorbat

1 mM AEBSF

pH 8.0

2.2.3.7. *In silico* Analyse der transgenen hpRNA mit Hilfe des Programms si-Fi

Eine dsRNA-Sequenz, die zur posttranskriptionellen Regulierung der Genexpression mittels RNA-Interferenz verwendet werden soll, muss sowohl auf ihre Spezifität zur Ziel-mRNA als auch auf eine mögliche Degradierung anderer mRNAs (*off-target effects*) überprüft werden (Naito *et al.*, 2005). Zur Untersuchung der hpRNA wurde das Programm „si-Fi 3.1.0.-0001“ (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben) verwendet. Das Programm prognostiziert *in silico* siRNA-Sequenzen, welche durch dsRNA in Pflanzenzellen generiert werden könnten. Ein Algorithmus untersucht die zu erwartenden siRNAs zum einen auf Funktionalität zur Ziel-mRNA als auch auf eine ungewollte Herunterregulierung der Expression von anderen Genen. Dazu wurden Datenbanken mit Hilfe der GenBank[®] des National Centers for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erstellt, indem alle zur Verfügung stehenden mRNA-Sequenzen und alle vorliegenden *expressed sequence tags* (EST) einer Spezies im FASTA-Format vereint wurden. Bei *expressed sequence tags* handelt es sich um kurze, sequenzierte cDNA-Fragmente von 200-700 bp Länge (Lazo *et al.*, 2004). Dies ermöglicht ein größeres Spektrum zur Identifizierung einer unerwünschten Herunterregulierung der Expression von anderen Genen. Die Analysen wurden mit den Standardparametern des Programms durchgeführt.

2.2.4. Herstellung einer Phagen-Bibliothek

Zur Identifikation von Nanobodies, die mit einer hohen Affinität an Faktor H binden und zur Inhibierung der Plasmodienentwicklung im Darm der Mücke eingesetzt werden sollten, musste zunächst eine Phagen-Bibliothek hergestellt werden. Diese Bibliothek basierte auf cDNA-Sequenzen von Einzeldomänenantikörpern, die aus einem immunisierten Alpaka/Lama-Hybrid gewonnen wurden.

2.2.4.1. Herstellung der cDNA-Bibliothek

Die Herstellung der cDNA-Bibliothek erfolgte an der Vrije Universiteit Brussel in der Arbeitsgruppe „Laboratory of cellular and molecular immunology“ durch Dr. Feyi Obishakin. Im Vorfeld wurde dazu einem Alpaka/Lama-Hybrid Faktor H mit komplettem Freund-Adjuvans subkutan injiziert. Danach wurden im wöchentlichen Abstand fünf weitere Injektionen mit Faktor H in inkomplettem Freund-Adjuvans durchgeführt, so dass insgesamt ca. 58 µg des Antigens zur Immunisierung des Tieres eingesetzt wurden. Dabei diente das Adjuvans der Stimulation und Verbesserung der Immunantwort (Leroux-Roels, 2010). Komplettes Freund-Adjuvans besteht aus Mineralöl, hitzeinaktivierten Mykobakterien und einem Emulgator, bei inkomplettem Freund-Adjuvans wurden die Mykobakterien entfernt (Petrovsky und Aguilar, 2004). Vier Tage nach der letzten Injektion wurden dem Tier 75 ml frisches Blut entnommen, welches mit 75 ml 0.9% (w/v) NaCl-Lösung verdünnt wurde. Anschließend wurden mit Hilfe von LymphoprepTM (Takeda) die peripheren Blutlymphozyten nach Angaben von Ghassabeh *et al.* (2010) isoliert. Die RNA-Extraktion aus den Lymphozyten erfolgte mit TRIzol[®] (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers. Als nächstes wurden 40 µg RNA zur Synthese der ersten cDNA-Stränge nach Ghassabeh *et al.* (2010) eingesetzt. Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurden die SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) und Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.4.2. PCR-Amplifikation der VHH-Sequenzen

Zur Isolierung der VHH-Sequenzen wurden die cDNA-Sequenzen der Nanobodies von den cDNA-Sequenzen der variablen Domäne von schweren Ketten konventioneller IgG-Antikörper mit Hilfe einer *Nested* PCR (2.2.1.1) getrennt. Dazu wurde die cDNA-Bibliothek (2.2.4.1) als Matrize für die erste PCR verwendet. Als Primer wurden der Leader-Sequenz spezifische Primer CALL001 und der CH2-spezifische Primer CALL002 (vgl. Tabelle 2.2) eingesetzt. Dabei wurden Amplikons von ca. 700 bp (VHH-hinge-CH2-Region der HCAbs) und von ca. 900-1000 bp (VH-CH1-hinge-CH2-

Region der konventionellen IgGs) erwartet. Um die optimalen Redaktionsbedingungen zu bestimmen, wurden vorab PCRs mit unterschiedlichen Konzentrationen der cDNA als Matrize durchgeführt. Die Amplifikation wurde unter Verwendung einer FastStart *Taq*-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics) durch eine *hot start* PCR durchgeführt. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung der Primer an die DNA und die Formung von Primer-Dimeren reduziert, da die Polymerase bei Temperaturen unter 75°C inaktiv ist und erst nach einem vier Minuten andauernden Inkubationsschritt bei 95°C aktiviert wird (Birch, 1996). Nach der PCR wurden die Amplifikate gelelektrophoretisch mit einem 1% (w/v) Agarosegel in 1×TBE-Puffer aufgetrennt. Daraufhin wurden die PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 700 bp aus dem Agarosegel mit Hilfe des GenElute™ Gel Extraction Kits (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Durch eine zweite Scale-up-PCR wurden die cDNA-Sequenzen der VHHs vervielfältigt. Dabei wurden zur späteren Klonierung mit Hilfe des Primers A6E eine *Pst*I-Schnittstelle an das 5'-Ende und durch den Primer 38 die Restriktionsschnittstellen *Bst*EII und *Not*I an das 3'-Ende der cDNA-Sequenzen angefügt. Zur Optimierung der PCR-Konditionen wurden im Vorfeld unterschiedliche cDNA-Konzentrationen als Matrize verwendet. Ausgehend von diesen Vorversuchen wurden 150 µl (ca. 525 ng) der VHH-hinge-CH2-cDNA als Matrize zur Amplifizierung verwendet. Dabei betrug die zu erwartende Bandengröße der VHH-Sequenzen ca. 400 bp. Als nächstes wurden 10 µl der Amplifikate durch eine Gelelektrophorese mit 1% (w/v) Agarosegel in 1×TBE-Puffer analysiert. Als letztes wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des GenElute™ PCR-Clean Up Kit (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

PCR-Programm zur Amplifikation der VHH-Sequenzen:

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	95°C	7:00	
Denaturierung	94°C	1:00	
Annealing	55°C	1:00	32× / 17×
Elongation	72°C	1:00	
Finale Elongation	72°C	10:00	
Ende	4°C	unbegrenzt	

Bei der ersten PCR zur Trennung der VHH-cDNA von der IgG-cDNA wurde die Amplifikation 32-mal, bei der zweiten PCR zur Vermehrung der VHH-cDNA 17-mal wiederholt.

<u>PCR-Ansatz zur Trennung der cDNA-Sequenzen:</u>		<u>PCR-Ansatz der Scale-up-PCR:</u>	
DNA-Matrize (PCR-Produkte)	48 µl	DNA-Matrize (PCR-Produkte)	150 µl
10×FastStart <i>Taq</i> -PCR-Puffer	120 µl	10×FastStart <i>Taq</i> -PCR-Puffer	250 µl
dNTP's (je 10 mM)	24 µl	dNTP's (je 10 mM)	50 µl
Primer Call001 (20 µM)	24 µl	Primers A6E (20 µM)	50 µl
Primer Call002 (20 µM)	24 µl	Primer 38 (20 µM)	50 µl
FastStart <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	6 µl	FastStart <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	12.5 µl
H ₂ O	954 µl	H ₂ O	1937.5 µl
Endvolumen	1200 µl	Endvolumen	2500 µl

2.2.4.3. Klonierung der VHH-Sequenzen in den Phagemid-Vektor pHEN4

Zur Herstellung einer Phagen-Bibliothek wurden die amplifizierten VHH-Sequenzen (2.2.4.2) zuerst in pHEN4-Phagemide (vgl. 2.2.1.4) ligiert. Dazu wurden die aufgereinigten PCR-Produkte der Scale-up-PCR mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Not*I (Roche Diagnostics) bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden mit Hilfe des GenElute™ Gel Extraction Kits (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Daraufhin wurde dieser Vorgang mit einer veränderten Inkubationszeit von sechs Stunden ein zweites Mal wiederholt.

<u>Erster Restriktionsverdaus der VHH-Sequenzen:</u>		<u>Zweiter Restriktionsverdaus der VHH-Sequenzen:</u>	
Produkte der Scale-up-PCR	450 µl	Produkte der Scale-up-PCR (verdaut)	176 µl
Puffer H	50 µl	Puffer H	20 µl
<i>Pst</i> I (40 U/µl)	5 µl	<i>Pst</i> I (40 U/µl)	2 µl
<i>Not</i> I (40 U/µl)	5 µl	<i>Not</i> I (40 U/µl)	2 µl
Endvolumen	510 µl	Endvolumen	200 µl

Gleichzeitig wurde ein Restriktionsverdaus des Phagemid-Vektors pHEN4 mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Not*I (Roche Diagnostics) bei 37°C über Nacht durchgeführt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte ebenfalls durch das GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers. Nun wurde der Restriktionsverdaus mit einer Inkubationszeit von sechs Stunden wiederholt. Daraufhin wurden zum Ansatz 2 µl *Xho*I (Roche Diagnostics (40 U/µl)) gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die *Xho*I-Schnittstelle ist zwischen der *Pst*I- und *Not*I-Schnittstelle lokalisiert. Somit wurde durch die Zugabe des Restriktionsenzym *Xho*I die Wahrscheinlichkeit minimiert, dass der Vektor pHEN4 bei einer Spaltung durch *Pst*I oder *Not*I wieder

mit sich selbst ligieren konnte (vgl. Abbildung 7.1). Als nächstes wurde der zweite Restriktionsansatz aufgereinigt.

<u>Erster Restriktionsverdau von pHEN4:</u>		<u>Zweiter Restriktionsverdau von pHEN4:</u>	
pHEN4 (60 µg)	441 µl	pHEN4 (verdaut)	430 µl
H ₂ O	351 µl	H ₂ O	138 µl
Puffer H	90 µl	Puffer H	60 µl
<i>Pst</i> I (40 U/µl)	9 µl	<i>Pst</i> I (40 U/µl)	2 µl
<i>Not</i> I (40 U/µl)	9 µl	<i>Not</i> I (40 U/µl)	2 µl
Endvolumen	900 µl	Endvolumen	632 µl

Die Qualität der Restriktionsverdaus von den VHH-Sequenzen und dem Phagemid-Vektor wurde durch eine Gelelektrophorese mit einem 1% (w/v) Agarosegel in 1×TBE-Puffer überprüft. Anschließend wurden unterschiedliche Test-Ligationen, Transformationen von kompetenten TG1-Zellen und Bestimmungen der Transformationseffizienz zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Insert zu Phagemid durchgeführt.

Die Ligation wurde in drei 150 µl Volumina angesetzt und für vier Stunden bei 16°C inkubiert. Danach wurden 25 µl eines Vorgemisches zu jedem Ligationsansatz gegeben. Anschließend wurde die Inkubation bei 16°C über Nacht fortgeführt.

<u>Ligationsansatz:</u>		<u>Vorgemisch:</u>	
H ₂ O	93.2 µl	H ₂ O	5.5 µl
10×Ligationspuffer	15 µl	10×Ligationspuffer	8.5 µl
pHEN4 (4.4 µg) (verdaut)	32 µl	pHEN4 (4.4 µg) (verdaut)	32 µl
VHH-Sequenz (1.7 µg) (verdaut)	7.3 µl	VHH-Sequenz (1.7 µg) (verdaut)	36 µl
T4-Ligase (5 U/µl)	2.5 µl	T4-Ligase (5 U/µl)	3 µl
Endvolumen	150 µl	Endvolumen	85 µl

Die Aufreinigung der Ligationsansätze wurde mit Hilfe des GenElute[™] PCR-Clean Up Kits (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und nachfolgend durch eine Gelelektrophorese mit einem 1% (w/v) Agarosegel in 1×TBE-Puffer überprüft.

2.2.4.4. Transformation von elektrokompetenten TG1-Zellen mit pHEN4

Zur Herstellung einer Phagen-Bibliothek wurden elektrokompetente TG1-Zellen (2.2.1.6) mit dem Ligationsansatz (2.2.4.3) durch Elektroporation transformiert. Zur Bestimmung der einzusetzenden Menge des Ligationsansatzes wurden mehrere Transformationen mit unterschiedlichen Konzentrationen von ligierten Phagemiden durchgeführt. Als nächstes wurde die vorab bestimmte Menge des Ligationsansatzes zu 1 ml kompetenten TG1-Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Daraufhin wurden je 65 µl des Transformationsansatzes in eine gekühlte Elektroküvette gegeben. Im Anschluss an die Trocknung der Aluminiumelektroden wurde die Küvette in den *E. coli* Pulser™ (Bio-Rad) eingesetzt, um bis zum Ertönen eines Signaltons eine Spannung von 2.5 kV anzulegen. Nun wurde zweimal hintereinander die Küvette mit je 400 µl SOC-Medium ausgespült und die Bakterien wurden in einem 15 ml Röhrchen gesammelt. Anschließend wurden die transformierten Zellen zur Expression des Ampicillinresistenz-Gens eine Stunde lang bei 37°C und 650°UpM kultiviert. Nach der Inkubation wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) mit 100 µl der transformierten Zellen in SOC-Medium durchgeführt. Von diesen Verdünnungen wurden je dreimal 100 µl auf LB-Amp-Glu-Platten zur späteren Berechnung der Bibliotheksgröße ausplattiert. Die restlichen transformierten TG1-Zellen wurden auf fünf große LB-Amp-Glu-Platten gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Bakterienrasen mit Hilfe eines Einweg-Zellschabers und 2 ml LB-Medium pro Platte in ein 50 ml Röhrchen überführt und bis zu einem Endvolumen von 20 ml in LB-Medium resuspendiert. Nun wurden 5 ml Glycerol hinzugegeben, durch Invertieren gemischt, je 800 µl der Bakterienzellen in 1.5 ml Reagiergefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurden als Kontrollen je 50 µl kompetente TG1-Zellen ohne Zugabe des Ligationsansatzes bzw. mit dem Phagemid pHEN4 transformiert, auf LB-Amp-Glu-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOB-Medium (100 ml):

Pepton	2 g
Hefeextrakt	0.5 g
2 M NaCl	0.5 ml
250 mM KCl	1 ml

SOC-Medium (25 ml):

20% (v/v) Glucose	500 µl
1 M MgSO ₄	250 µl
2 M MgCl ₂	125 µl
ad 25 ml SOB Medium	

Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte durch ein Colony Screening (2.2.1.11) unter Verwendung der Primer RP und GIII (vgl. Tabelle 2.2). PCR-Produkte eines religierten pHEN4-Vektors wurden mit einer Größe von ungefähr 340 bp und Amplifikate auf Grund einer inserierten VHH-Sequenz von ungefähr 700 bp erwartet.

2.2.5. Phagen-Display

Beim Phagen-Display handelt es sich um eine Methode zur Selektion und Identifizierung von Proteinen oder Peptiden aus einer großen, rekombinanten Bibliothek mit einer hohen Affinität zu einem bestimmten Zielmolekül (Smith, 1985). Dabei werden filamentöse Bakteriophagen (z.B. M13 Phagen) verwendet, bei denen die Replikation und Assemblierung ohne Absterben des Wirtsbakteriums stattfindet. Das Grundprinzip des Phagen-Displays beruht auf der Verbindung des rekombinanten Genotyps mit dem dazugehörigen Phänotyp. Die zu selektierenden Proteine bzw. Peptide werden mit Oberflächenproteinen der Phagen, wie z.B. dem Protein pIII, fusioniert. Diese Fusionsproteine werden dann während der Phagen-Assemblierung in die Phagenpartikel eingebaut, während sich im Capsid die dazugehörige genetische Information in Form von zirkulärer, einzelsträngiger DNA befindet (Paschke, 2006). In Abbildung 2.3 ist ein M13-Phage schematisch dargestellt, welcher Nanobodies als VHH-pIII-Fusionsproteine präsentiert.

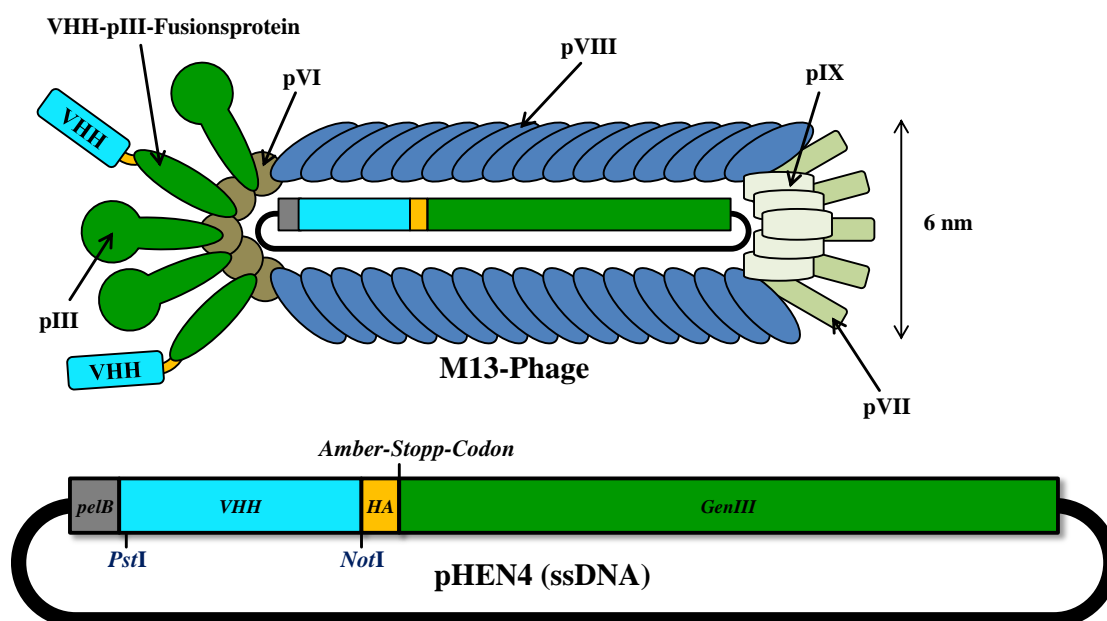


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung eines rekombinanten M13-Phagen (in Anlehnung an Wesolowski *et al.*, 2009; Paschke, 2006; Kehoe und Kay, 2005). Die VHH-Sequenz wird über die Schnittstellen *PstI* und *NotI* in das Phagemid pHEN4 eingefügt. Durch Verwendung von M13KO7-Helferphagen wird der Vektor in einem Viruspartikel verpackt und kann für das Panning eingesetzt werden. *pelB*: bakterielle Leadersequenz für den Transport in den periplasmatischen Raum. *VHH*: Variable Domäne der schweren Kette von Schwerekettenantikörpern. *HA*: Hämagglutinin-Tag. pIII, pVI, pVIII, pVII, pIX: verschiedene Oberflächenproteine der M13-Phage.

Die Selektion von Proteinen, welche an ein bestimmtes Zielprotein binden sollen, wird mit Hilfe einer rekombinanten Bibliothek durchgeführt. Dabei handelt es sich um *E. coli*-Zellen, welche mit

Phagemiden (vgl. 2.1.12) transformiert wurden. In diesen Phagemiden liegen die cDNA-Sequenzen von jeweils einem möglichen Binder gegen das Zielprotein vor. Da eine Phagen-Bibliothek einen Umfang von bis zu 10^{11} Bakterien haben kann (Carmen und Jermutus, 2002), gleicht die Selektion von Proteinen, die eine hohe Affinität zum Zielprotein aufweisen sollen, der Suche nach einer Nadel im Heuhaufen. Daher erfolgt die Auslese der Phagen durch eine Affinitätsselektion mit dem immobilisierten Zielprotein. Diese Prozedur wird Panning (2.2.5.2) genannt und ist schematisch in Abbildung 2.4 dargestellt.

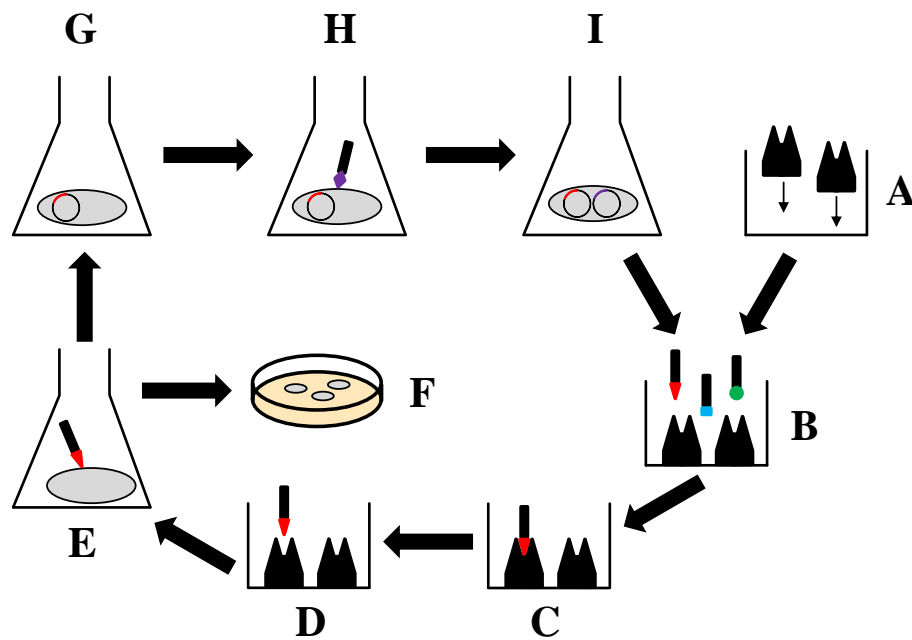


Abbildung 2.4 Schematische Übersicht einer Panningrunde (in Anlehnung an Muyldermans, 2001; Carmen und Jermutus, 2002). A: Das Zielprotein wird in eine Kavität einer ELISA-Platte immobilisiert. B: Phagen, die unterschiedliche Binder als Fusionsprotein präsentieren, werden mit dem Zielprotein inkubiert. C: Ungebundene Phagen werden durch einen Waschvorgang entfernt. D: Die gebundenen Phagen werden eluiert. E: *E. coli*-Bakterien werden mit den eluierten Phagen infiziert. F: Einige der infizierten Bakterien werden zur Auswertung auf Selektionsplatten ausgestrichen. G: Die restlichen infizierten Bakterien werden kultiviert. H: Zur Produktion von Phagen, welche mögliche Binder präsentieren, werden zur Superinfektion Helfer-Phagen zur Bakteriensuspension gegeben. I: Die Replikation und Assemblierung der Phagen, die einen erhöhten Anteil an Bindern aufweisen, erfolgt für die Verwendung in der nächsten Panningrunde.

Das Selektionsmedium ist zusätzlich mit Glukose angereichert, um den *lacZ*-Promoter und damit eine Produktion des Fusionsproteins zu unterdrücken. Zu den Bakterien, welche die Phagemide aufgenommen haben, werden zur Superinfektion Helfer-Phagen (2.1.11) gegeben. Erst dann werden Viruspartikel produziert, die zum einen die rekombinanten Proteine präsentieren und zum anderen auch infektiös sind (vgl. Abbildung 2.3). Nach zwei bis drei Panningrunden hat sich dann eine

Phagenpopulation angereichert, deren Phagen zu einem hohen Prozentteil Proteine mit einer Affinität zu dem Zielprotein präsentieren (Carmen und Jermutus, 2002). Als nächstes werden die ausplattierten Bakterien mittels PE-ELISA (2.2.5.3) untersucht. Anschließend werden die identifizierten Binder produziert und charakterisiert.

2.2.5.1. Herstellung von Nanobody-präsentierenden Phagen

Zur Durchführung des Phagen-Displays wurden als erstes Phagen produziert, die unterschiedliche Nanobodies auf ihren Oberflächen präsentierten. Dazu wurden 800 µl TG1-Zellen aus der Phagen-Bibliothek 1 (2.2.4) in 100 ml 2×TY-Medium gegeben, welches mit Ampicillin und 5 ml einer 20% (w/v) Glucose-Lösung versetzt war. Danach erfolgte eine Kultivierung der Zellen von zwei bis drei Stunden bei 37°C und 200 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.1. Während dieser Wachstumsphase bildeten die TG1-Bakterien F-Pili aus, welche die Helferphagen zur Infektion benötigen (Karlsson *et al.*, 2003). Nach einer Zugabe von 10¹² M13K07-Phagen (Life Technologies) wurden die Bakterien eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde die infizierte Bakterienkultur auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt und für 10 Minuten bei 1500×g und 4°C pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 300 ml 2×TY-Medium, welches mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (70 µg/ml) versetzt war, resuspendiert. Nun wurden bei einer Kultivierung über Nacht (37°C, 200 UpM) filamentöse Phagen produziert, welche Nanobodies auf ihrer Oberfläche präsentierten. Am nächsten Tag wurde eine Zentrifugation (30 min, 11300×g, 4°C) durchgeführt, um je 40 ml des Überstands in 50 ml Röhrchen zu überführen. Daraufhin wurden in jedes Röhrchen 10 ml PEG/NaCl-Lösung gegeben, um anschließend fünfmal zu invertieren und 30 Minuten lang auf Eis zu inkubieren. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 3300×g, 4°C) wurden die Überstände entfernt. Nun wurden alle Phagen-Pellets in einem Endvolumen von 1 ml PBS resuspendiert und zur Entfernung von bakteriellen Zellpartikeln und aggregierten Phagen zentrifugiert (2 min, 18000×g, 4°C). Anschließend wurde der Überstand in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt. Zur Bestimmung der Phagenkonzentration wurde die Absorption einer 1:50 Verdünnung des Überstandes bei 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 ungefähr 3×10¹⁰ Phagen pro Milliliter (Ghassabeh *et al.*, 2010). Die produzierten Phagen wurden nun zur Durchführung einer Panningrunde (2.2.5.2) verwendet.

PEG/NaCl-Lösung:

20% (w/v) Polyethylenglycol 6000

2.5 M NaCl

2.2.5.2. Panning

Zur Identifizierung und Anreicherung von Phagen, die auf ihrer Oberfläche Faktor H bindende Nanobodies präsentieren, wurden drei Panningrunden durchgeführt. Als erstes wurden 100 µl einer Faktor H-Lösung, die aus 10 µg Faktor H und 100 µl PBS bestand, in eine Kavität einer ELISA-Platte (Immuno Plate F96 Maxisorp, Nunc) gegeben. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine andere Kavität mit 100 µl PBS befüllt. Anschließend fand eine Inkubation über Nacht bei 4°C statt. Des Weiteren wurden TG1-Zellen aus einem Glycerolstock (2.2.1.17) entnommen, auf Glucose-Minimal-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium überführt und bei 37°C und 200 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bis 1 kultiviert. Währenddessen wurden die Kavitäten der ELISA-Platte entleert und jeweils fünfmal mit PBST gewaschen. Während der ersten beiden Panningrunden wurden je 200 µl einer Blockierungslösung (2% (w/v) Magermilchpulver in PBS (pH 7.4)) in beide Kavitäten gegeben, um anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur zu inkubieren. Während der dritten Panningrunde wurde die Blockierung durch die Verwendung von je 300 µl „Protein-Free (PBS) Blocking Buffer“ (Life Technologies) durchgeführt. Daraufhin wurden die blockierten Kavitäten fünfmal mit PBST gewaschen. Als nächstes wurden je 10¹¹ Phagen, welche Nanobodies auf ihrer Oberfläche präsentierten, in 100 µl PBS überführt und in jede der beiden Kavitäten gegeben. Während der anschließenden Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur sollten die VHH-Phagen spezifisch an Faktor H binden. Zur Entfernung der ungebundenen Phagen wurden die beiden Kavitäten nach der ersten Panningrunde zehnmal, nach der zweiten fünfundzwanzigmal und nach der dritten Panningrunde zwanzigmal mit PBST gewaschen. Um die gebunden Phagen zu eluieren, wurden in jede Kavität 100 µl frische TEA-Lösung (70 µl Triethylamin in 5 ml H₂O) gegeben. Nach einer zehnminütigen Inkubation wurden die dissoziierten Phagen in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt. Dann wurde der Ansatz durch Zugabe von 100 µl 1 M Tris (pH 8.0) neutralisiert.

Als nächstes wurden TG1-Zellen mit den eluierten Phagen infiziert. Dadurch wurden zum einen Einzelkolonien für einen PE-ELISA (2.2.5.3) generiert und zum anderen wurden die Phagen für die nächste Panningrunde amplifiziert. Zum Erhalt von Einzelkolonien wurde auf einer ELISA-Platte mit je 10 µl der eluierten Phagen eine Verdünnungsreihe (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷) durch Verwendung von je 90 µl PBS durchgeführt. In die letzte Kavität wurden 100 µl PBS als Kontrolle pipettiert. Anschließend wurden je 10 µl aus allen acht Kavitäten zu je 90 µl TG 1-Zellen gegeben. Zur Infektion der Bakterien fand eine halbstündige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Als nächstes wurden je 10 µl der infizierten TG1-Zellen auf einer rechteckigen LB-Amp-Glu-Platte ausgestrichen

und über Nacht bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden die übrigen 90 µl der TG1-Verdünnungen (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) auf runden LB-Amp-Glu-Platten ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Vorbereitung der nächsten Panningrunde wurden 180 µl der eluierten Phagen zu 2 ml TG1-Zellen gegeben, die sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden. Damit die Phagen die Bakterien infizierten, wurde eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Als nächstes wurden die infizierten TG1-Zellen in 8 ml 2×TY-Medium überführt, welches mit Glucose (2% (w/v)) und Ampicillin (100 µg/ml) versetzt war. Nach einer Kultivierung von 30 Minuten bei 37°C und 200 UpM wurden 10^9 M13K07-Phagen (Life Technologies) zu den Bakterien gegeben. Zur Infektion der Bakterien mit den Helferphagen wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000×g, 10 min, RT) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 300 ml 2×TY-Medium resuspendiert, welches mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (70 µg/ml) versetzt war. Zur Amplifizierung der eluierten VHH-Phagen wurden die TG1-Zellen über Nacht bei 37°C und 200 UpM kultiviert.

2.2.5.3. Untersuchung von Einzelkolonien mittels PE-ELISA

Zur Identifizierung potenzieller Nanobodies, die spezifisch gegen Faktor H binden, wurde der periplasmatische Extrakt (PE) von Bakterienkulturen mit Hilfe eines ELISAs (2.2.2.4) untersucht. Dazu wurden Einzelkolonien aus der zweiten und dritten Panningrunde (2.2.5.2) in je 1 ml TB-Amp-Medium resuspendiert, in eine Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten überführt und bei 37°C und 200 UpM fünf Stunden lang kultiviert. Gleichzeitig wurde von jeder dieser Einzelkolonien ein Ausstrich auf einer LB-Amp-Glucose-Platte durchgeführt, welche anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert wurde. Als nächstes wurden zu den Bakteriensuspensionen 10 µl einer 1 M IPTG-Lösung zur Induzierung der Produktion von VHH-pIII-Fusionsproteinen gegeben. Danach wurden die Bakterien bei 37°C und 200 UpM über Nacht kultiviert. Dabei wurden als Kontrollen zum einen TG1-Zellen, welche mit einem pHEN4-Vektor ohne Insert transformiert wurden, und zum anderen TB-Medium, welches mit Ampicillin versetzt wurde, verwendet. Für jede untersuchte Einzelkolonie wurde je eine Kavität einer ELISA-Platte (Immuno Plate F96 Maxisorp, Nunc) mit 100 µl einer Faktor H-Lösung (1.25 µg/ml) und je eine Kavität mit 100 µl PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Kavitäten der ELISA-Platte geleert, dreimal mit PBST gewaschen und für eine Stunde mit je 200 µl einer Blockierungslösung (2% Magermilchpulver in PBS (pH 7.4)) inkubiert. Daraufhin wurden die blockierten Kavitäten erneut dreimal mit PBST gewaschen.

Währenddessen wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert (2000×g, 12 min, 4°C) und der Überstand wurde entfernt. Nun erfolgte eine Lyse der Zelle durch osmotischen Schock, indem zuerst 200 µl TES-Lösung zu den Zellen gegeben wurden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C und 200 UpM wurden 300 µl einer 1:4 mit Wasser verdünnten TES-Lösung zu den Bakterien gegeben, welche erneut eine Stunde lang bei 4°C und 200 UpM geschüttelt wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt (2000×g, 12 min, 4°C) wurden je 100 µl der Überstände, in dem sich der periplasmatische Extrakt und somit die VHH-pIII-Fusionsproteine befanden, in je eine Kavität mit gebundenen Faktor H und in je eine Kavität, welche zuvor mit PBS inkubiert wurde, gegeben. Als Kontrolle wurden in zwei Kavitäten, welche auch entweder mit Faktor H oder mit PBS beschichtet wurden, je 100 µl PBS gegeben. Damit potenzielle Nanobodies an das Antigen binden konnten, wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBST wurden in jede Kavität 100 µl des primären Anti-HA-Antikörpers (1:2000 Verdünnung mit PBS) gegeben. Dieser Antikörper bindet spezifisch an eine kurze Aminosäuresequenz von Hämagglutinin (HA-Tag) und diente so zum Nachweis der Fusionsproteine, welche an die Antigene gebunden hatten.. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem fünffachen Waschschritt mit PBST wurden 100 µl des sekundären Anti-Kaninchen-IgG-AP-Antikörpers (1:7000 Verdünnung mit PBS) in jede Kavität pipettiert. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den Anti-HA-Antikörper und wurde auf Grund einer konjugierten alkalischen Phosphatase zum indirekten Nachweis der VHH-pIII-Fusionsproteine eingesetzt, die an Faktor H gebunden hatten. Nach einer erneuten Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden fünf Waschschritte mit PBST durchgeführt.

Anschließend wurden in jede Kavität 100 µl einer Substratlösung für die alkalische Phosphatase gegeben und die ELISA-Platte wurde in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung des Farbumschlags fand bei einer OD₄₀₅ nach 15 und nach 30 Minuten statt. Vor der letzten Messung wurde die Reaktion durch die Zugabe von 25 µl 3 M NaOH-Lösung beendet. Eine Einzelkolonie wurde für weitere Analysen ausgesucht, wenn nach dem Farbumschlag der Quotient des Absorptionswertes einer Kavität, die mit Faktor H beschichtet wurde, und der Absorptionswert einer unbeschichteten Kavität mindestens über zwei lag (Ghassabeh *et al.*, 2010).

AP-Substratlösung:

2 mg/ml Phosphatase Substrat

1 M Diethanolamin

0.5 mM MgCl₂

pH 9.8

Mit den ausgewählten Kolonien wurde ein Colony Screening mit den Primern RP und GIII durchgeführt, um das Vorhandensein einer VHH-cDNA zu bestätigen. Bei einer Amplifikatgröße von ca. 650 bp wurden TG1-Zellen der untersuchten Kolonien in jeweils 5 ml LB-Amp-Glu-Medium überführt und bei 37°C und 200 UpM über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine DNA-Präparation mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I (VWR International) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Daraufhin wurden die cDNA-Sequenzen der Nanobodies, welche in den pHEN4-Vektor ligiert worden waren (2.2.4.3), mit Hilfe der Primer RP und GIII durch eine Sequenzierung (2.2.1.18) bestimmt. Anschließend wurden ausgewählte Nanobody-Sequenzen in den Expressionsvektor pHEN6(c) kloniert.

2.2.6. Methoden zur Arbeit mit *Anopheles stephensi*

2.2.6.1. Zucht von *Anopheles stephensi*

Die Zucht der *Anopheles*-Mücken erfolgte nach Vorgaben von Simon *et al.*, 2013. Dazu wurden die Insekten bei zwölf Stunden Beleuchtung pro Tag, 26°C und 80% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Imagines wurden in Käfigen und die larvalen Stadien in mit Wasser gefüllten Plastikwannen kultiviert. Zur täglichen Fütterung wurden Wattepad's auf die Oberseite der Käfige gelegt und mit einer sterilen Zuckerlösung befeuchtet. Vier bis fünf Tage alte, weibliche *Anopheles*-Mücken wurden zur Initiierung der Eierproduktion mit ungefähr 2 ml menschlichem Blut gefüttert, das dazu auf die Unterseite einer Glasflasche gegeben wurde. Nach der Fixierung des Blutes mittels Parafilm wurde die Flasche auf die Oberfläche des Käfigs gestellt und mit warmem Wasser gefüllt. Nachdem die weiblichen Mücken das Blut aufgenommen hatten, wurde zwei bis drei Tage später eine mit Wasser gefüllte und mit Filterpapier ausgekleidete Schale in den Käfig gestellt. Am nächsten Tag wurden die Eier in mit Wasser gefüllte Plastikwannen überführt, um die Larven bis zur Verpuppung mit Katzentrockenfutter zu füttern. Anschließend wurden die Puppen in eine mit Wasser gefüllte Schale überführt, die in einen Käfig platziert wurde. Nun wurde das Gefäß mit Filterpapier bedeckt, in dessen Mitte ein Loch geschnitten wurde. Damit wurde verhindert, dass die geschlüpften Imagines zurück in die Schale flogen und dort ertranken. Mit der neuen Generation von *Anopheles*-Mücken wurde der

Entwicklungszyklus wieder durch eine Blutmahlzeit initiiert. Zur Zucht wurde voll entsalztes Wasser mit einem Gehalt von 1‰ (w/v) Meersalz verwendet.

Zuckerlösung

10% (w/v) Saccharose

0.05% (w/v) p-Aminobenzoesäure

2.2.6.2. RNA-Extraktion aus *Anopheles stephensi*-Köpfen

Zur Analyse der RNA aus *Anopheles stephensi*-Mücken wurden die Insekten zunächst in eine gekühlte Petrischale gelegt. Danach wurden ca. 50 Insektenköpfe mit einem Skalpell von den Körpern abgetrennt, in ein 1.5 ml Reagiergefäß gegeben und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurden die pulverisierten Köpfe in 500 µl PBS (pH 7.4) überführt. Zur Entfernung der unlöslichen Bestandteile wurde ein Zentrifugationsschritt (3000×g, 10 min, 4°C) durchgeführt und anschließend wurden 100 µl des Überstandes mit 1 ml peqGOLD Trifast™ (VWR International) vermischt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (12000×g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt und daraufhin ein fünfminütiger Inkubationsschritt zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe durchgeführt. Als nächstes wurden 200 µl Chloroform zum Ansatz gegeben, welcher nun 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt wurde. Nach einem siebenminütigen Inkubationsschritt wurde zur Bildung von drei Phasen zentrifugiert (12000×g, 5 min, 4°C). Die RNA befand sich in der wässrigen Phase, während sich Proteine und DNA in der Interphase und der roten Phenol-Chloroform-Phase anreicherten. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt und als Kopräzipitat 10 µl inertes Glykogen hinzugefügt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol, mehrmaligem Invertieren und einer fünfzehnminütigen Inkubation auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt (12000×g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol durch Mischen und Zentrifugieren (12000×g, 10 min, 4°C) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Schluss wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser während eines zehnminütigen Inkubationsschritts bei 60°C gelöst. Die Lagerung der extrahierten RNA fand bei -80°C statt.

Die RNA aus weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken wurde zur Analyse mittels quantitativer Real-time-PCR mit Hilfe des GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich) extrahiert. Dazu wurden die Mückenköpfe in 500 µl Lysispuffer gegeben, der zuvor mit 5 µl

β -Mercaptoethanol versetzt worden war. Anschließend wurde eine Homogenisierung mittels Ultraschall durchgeführt. In den nachfolgenden Aufreinigungsschritten wurde das Kit nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.2.6.3. Transmission-Blocking-Assay

Der Transmission-Blocking-Assay wurde von Dr. Matthias Scheuermayer am Institut für Molekulare Infektionsbiologie an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg nach Vorgaben von Simon *et al.* (2013) durchgeführt. Durch das *in vivo* Experiment wurden die Nanobodies (vgl. Abbildung 3.21) auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der Plasmodienentwicklung im Darm der Mücke durch Bindung von Faktor H überprüft. Als erstes wurden weibliche *Anopheles stephensi* Mücken mit einer 5% (w/v) Saccharoselösung, die mit p-Aminobenzoessäure und Gentamicin (40 μ g/ml) versetzt worden war, bis zum Tag der Versuchsdurchführung gefüttert (Beier *et al.*, 1994). Für den Fütterungsansatz wurden 50 μ l A⁺-Erythrozyten mit reifen NF54-Gametozyten (Gametozytemie 0.25%), 15 μ l frisches A⁺-Serum, das unmittelbar vor dem Experiment gewonnen wurde, und 35 μ l der jeweiligen Nanobody-Lösung bei 37°C vermischt. Die Nanobodies wurden mit der höchst möglichen Konzentration (vgl. Tabelle 3.11) appliziert, um einen maximalen inhibitorischen Effekt erzielen zu können. Als Kontrollen wurden anstelle der Nanobodies zum einen normales Kaninchenserum (NKS) und zum anderen PBS verwendet. Durch die Fütterung mit dem Kaninchenserum sollte überprüft werden, ob die spezifisch an Faktor H bindenden Nanobodies oder die im Serum befindlichen unspezifischen Antikörper für eine Reduktion der Oocystenanzahl verantwortlich sind. Jeder Ansatz wurde 3-5 Tage alten, weiblichen Mücken 20 Minuten lang zur Nahrungsaufnahme angeboten (Bishop und Gilchrist, 1946). Anschließend wurden nur Individuen mit angeschwollenen Abdomen gesammelt, um nach zehn Tagen die Mitteldärme der Mücken zu präparieren und durch Merbromin (0.2% in PBS) anzufärben. Die Anzahl der Oocysten pro Mitteldarm wurde unter einem Mikroskop ausgewertet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Malaria gefährdet weltweit das Leben vieler Menschen in den meisten tropischen und subtropischen Regionen (Lee *et al.*, 2015). So waren im Jahr 2014 3.3 Milliarden Bürger einem stetigen Infektionsrisiko ausgesetzt (WHO, 2014). Dabei sind vorwiegend schwangere Frauen und Kleinkinder von einem tödlichen Krankheitsverlauf betroffen (Crompton *et al.*, 2014). Wirkstoffresistenzen der Plasmodien, Insektizidresistenzen der *Anopheles*-Mücken sowie das Fehlen eines effizienten Impfstoffes erschweren eine Verringerung der Malariaerkrankungen entscheidend (WHO, 2014). Bislang ermöglichen die konventionellen Methoden keinen maßgeblichen Erfolg bei der globalen Beseitigung von Malaria, so dass dringend alternative Strategien entwickelt werden müssen. Da sich besonders transgene Pflanzen zur einfachen und kostengünstigen Produktion rekombinanter Proteine in Ländern mit einer schwachen technologischen Infrastruktur eignen (Conrad *et al.*, 2011), sollten mit dieser Arbeit die Grundlagen zur Entwicklung einer synergistischen und innovativen Strategie zur Reduzierung von Malaria erforscht werden.

Die weiblichen *Anopheles*-Mücken brauchen neben einer Blutmahlzeit zur Eierproduktion auch natürliche Zuckerquellen als Nahrung, die hauptsächlich aus floralem Pflanzennektar besteht (Gu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2007). Der neuartige Ansatz dieser Arbeit besteht in der Idee, transgene Pflanzen zur Reduzierung der Malariaübertragung einzusetzen. Dazu sollen die Pflanzen in ihrem Nektar gegen die Entwicklung der Plasmodien gerichtete Substanzen produzieren. Nehmen weibliche Mücken nun die Wirkstoffe mit dem Nektar auf, würde die Übertragung der Malariaerreger auf den Menschen verhindert werden. Durch die kostengünstige Bepflanzung in der Nähe von menschlichen Behausungen würde so ein wirksamer Beitrag zur Reduktion von Malaria geleistet werden.

In dieser Arbeit wurden zwei methodisch verschiedene Ansätze als Maßnahmen gegen Malaria untersucht. Im ersten Teil sollte mit Hilfe von pflanzlich produzierten dsRNAs die Expression eines *apyrase*-Gens von *Anopheles stephensi* durch RNA-Interferenz reduziert werden. Eine mögliche Herunterregulation sollte dabei Aufschluss über die Möglichkeit geben, ob mit dieser Methode die Reduzierung der Expression von essentiellen Genen für die Infiltration der Speicheldrüsen erreicht werden kann. Im zweiten Teil der Arbeit sollten Nanobodies gegen Faktor H generiert werden und auf eine mögliche inhibitorische Wirkung auf den Lebenszyklus der Plasmodien im Mitteldarm der Mücke untersucht werden. Nach einer Blutmahlzeit ist das menschliche Komplementsystem im Darm der Mücken aktiv, so dass die Plasmodien Faktor H binden müssen, um nicht durch den alternativen Weg des menschlichen Komplementsystems lysiert zu werden (Simon *et al.*, 2013). Wird die Bindung von

Faktor H blockiert, können sich die Plasmodien in der Mücke nicht weiter entwickeln und damit nicht mehr auf den Menschen übertragen werden.

3.1. Teil 1: dsRNA-basierte Strategie gegen Malaria

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die Verwendung pflanzlich produzierter dsRNA zur Reduktion von Speicheldrüsenproteinen bei Mücken durch posttranskriptionelle Genregulation eignet. Die Invasion in die Speicheldrüsen der *Anopheles*-Mücken ist ein essentieller Schritt im Lebenszyklus der Plasmodien und wird durch spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen des Vektors mit dem Pathogen initiiert (Wang *et al.*, 2013). Dazu wurde stellvertretend für die Oberflächenproteine die Herunterregulation der Expression eines *apyrase*-Gens von *Anopheles stephensi* analysiert. Apyrasen befinden sich in den Speicheldrüsen von Hämatophagen und haben bei Mücken die Aufgabe, Adern vor der Blutmahlzeit zu lokalisieren. Des Weiteren hydrolysieren die Enzyme ATP zu ADP und ADP zu AMP, um so während des Saugvorgangs die Aggregation von Blutplättchen zu verhindern (Boisson *et al.*, 2006). Mit Hilfe stabil transformierter Pflanzen wurde spezifische hpRNA hergestellt und in Fütterungsversuchen den weiblichen *Anopheles*-Mücken appliziert. Nach Extraktion der RNA aus den Mücken wurde durch eine quantitative Real-time-PCR überprüft, ob die Anzahl der mRNAs, die zur Produktion der Apyrase dienen, im Vergleich zur Kontrollgruppe durch RNA-Interferenz reduziert wurde.

3.1.1. Generierung der Apyrase-cDNA aus *Anopheles stephensi*

Zur Generierung der Apyrase-cDNA wurde zunächst die Gesamt-RNA aus 48 Mückenköpfen mit peqGOLD TrifastTM (VWR International) extrahiert (2.2.6.2). Anschließend wurde durch eine Reverse Transkription mit dem sequenzspezifischen Primer pAPY201 die Erststrangsynthese durchgeführt (2.2.1.15). Zur Herstellung der doppelsträngigen cDNA erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion mit den Primern pAPY101 und pAPY201, einer *Pfu*-Polymerase und dem cDNA-Erststrang als Matrize (2.2.1.15). Die PCR-Produkte wurden in einem 1% (w/v) Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und die erwarteten Banden bei ungefähr 1000 bp mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey & Nagel) extrahiert (2.2.1.2). Daraufhin erfolgte eine Ligation in den pCRTM-Blunt-Vektor (2.2.1.4). Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes TOP10 per Hitzeschock transformiert (2.2.1.7). Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Colony Screening mit den Primern pAPY101 und pAPY201 (2.2.1.11). Kolonien, die eine

Amplifikatgröße von ungefähr 1000 bp aufwiesen, wurden über Nacht in 4 ml LB-Kan bei 37°C und 200 UpM kultiviert. Nach einer Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (2.2.1.12) erfolgte ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (2.2.1.16). Daraufhin wurden die inserierten DNA-Fragmente mit Hilfe der Primer M13 Reverse und M13 Forward sequenziert (2.2.1.18). Das Alignment erfolgte mit der „*Anopheles stephensi* salivary apyrase mRNA, complete cds“-Sequenz (Identifikationsnummer: AY162238.1) aus der GenBank®. Der Zugriff erfolgte über die Internetseite www.ncbi.nlm.nih.gov des National Centers for Biotechnology Information (NCBI). Dort ist jeder eingetragenen Nukleotidsequenz eine eindeutige Identifikationsnummer zugeteilt (Benson *et al.*, 2011). Bei der inserierten DNA handelte es sich um ein Fragment der *Anopheles stephensi* Apyrase-cDNA mit einer Länge von 1014 bp. Der pCR™-Blunt-Vektor mit dem inserierten cDNA-Fragment wurde pAPY1431#5 genannt. In Abbildung 3.1 sind die Apyrase-cDNA, das amplifizierte cDNA-Fragment und die Bindestellen der entsprechenden Primer schematisch dargestellt.

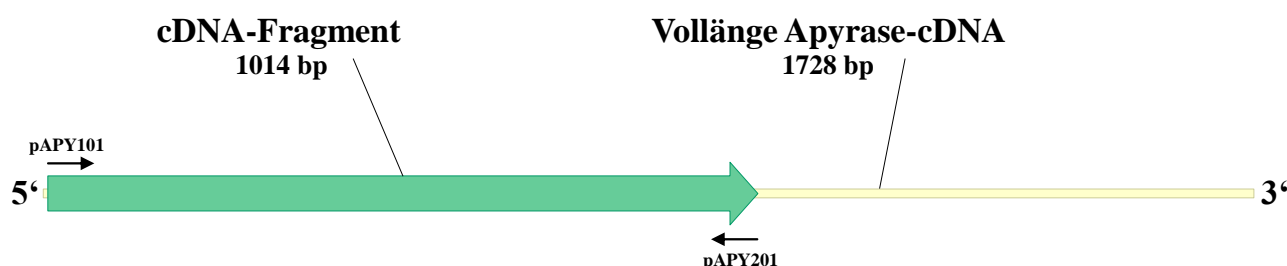


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Apyrase-cDNA und des amplifizierten cDNA-Fragments. Das cDNA-Fragment mit einer Länge von 1014 bp wurde mit den sequenzspezifischen Primern pAPY101 und pAPY201 amplifiziert und später als Matrize für eine PCR zur Klonierung in das Plasmid pHANNIBAL verwendet. Die Sequenz der vollständigen Apyrase-cDNA ist in der GenBank® unter der Identifikationsnummer AY162238.1 zu finden.

3.1.2. Klonierung von pAPY8141 zur Generierung spezifischer hpRNA mittels Tabakpflanzen

Zur Herstellung von dsRNA mit Hilfe von Tabakpflanzen wurde ein Fragment der Apyrase-cDNA (vgl. 3.1.1) in *sense*- und in *antisense*-Orientierung in das Plasmid pHANNIBAL kloniert. Anschließend wurde die Expressionskassette in den pflanzlichen Expressionsvektor pART27 zur Agrobakterien-vermittelten Transformation der Tabakpflanzen ligiert. Durch die Expression des Transgens sollten Pflanzen *hairpin*-RNAs produzieren, die zur oralen Applikation der *Anopheles*-Mücken eingesetzt werden sollten. Dadurch sollte die Genexpression des *apyrase*-Gens in den weiblichen Mücken durch RNA-Interferenz inhibiert werden.

Zur Klonierung des cDNA-Fragments wurden jeweils zwei Restriktionsschnittstellen mit Hilfe von entsprechend modifizierten Primern über eine PCR angefügt, so dass die Apyrase-cDNA später in

pHANNIBAL ligiert werden konnte. Für die PCR wurden die Primer pAPY301 und pAPY401, eine *Pfu*-Polymerase und das Plasmid pAPY1431#5 mit dem inserierten cDNA-Fragment als Matrize verwendet. Dabei wurden durch den Primer pAPY301 die Schnittstellen *Xho*I und *Xba*I an das 5'-Ende und durch den Primer pAPY401 die Schnittstellen *Hind*III und *Acc*65I an das 3'-Ende der cDNA-Sequenz angefügt. Da bei Fütterungsexperimenten mit Insekten die eingesetzten dsRNA-Fragmente meistens eine Größe zwischen 300 bp und 520 bp aufweisen (Huvenne und Smagghe, 2010), wurden 410 bp der cDNA-Sequenz zur Generierung der hpRNA ausgewählt. Auch induziert dsRNA, die eine Homologie von über 200 bp zu der Zielsequenz aufweist, in Nicht-Säugetiersystemen effizient die RNA-Interferenz (Barnard *et al.*, 2012). Des Weiteren müssen die dsRNAs mindestens 60 bp lang sein, damit eine effiziente Aufnahme durch die Insekten und eine entsprechend biologische Aktivität über RNA-Interferenz erfolgen kann (Zhang *et al.*, 2015). Daher sollten zur Konstruktion von stabiler und effizienter hpRNA zwischen 400-800 Nukleotide des codierenden Bereichs der Ziel-mRNA verwendet werden (Wesley *et al.*, 2001).

In Abbildung 3.2 ist das cDNA-Fragment zur Klonierung in den pflanzlichen Expressionsvektor pART27 schematisch dargestellt.

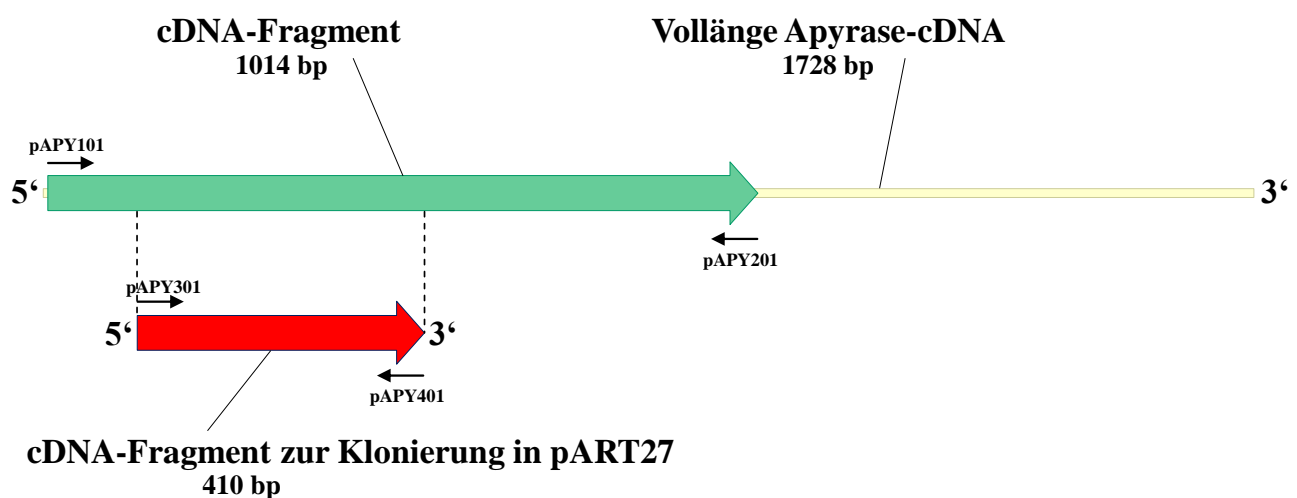


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung des cDNA-Fragments zur Klonierung in pART27. Das cDNA-Fragment der Apyrase wurde zur Herstellung einer Expressionskassette mit Hilfe des Klonierungsvektors pHANNIBAL verwendet. Dazu wurden durch den Primer pAPY301 die Schnittstellen *Xho*I und *Xba*I an das 5'-Ende und durch den Primer pAPY401 die Schnittstellen *Hind*III und *Acc*65I an das 3'-Ende der Sequenz angefügt. Später wurde die Expressionskassette in den pflanzlichen Expressionsvektor pART27 kloniert.

Als nächstes wurden die Amplifikate mittels eines 1% (w/v) Agarosegels gelelektrophoretisch aufgetrennt und die erwartete Bande von 438 bp unter Verwendung des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kits (Macherey & Nagel) extrahiert (2.2.1.2). Nach einer Ligation in den pCR™-Blunt-Vektor (2.2.1.4) wurden mit dem Ligationsansatz kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes TOP10 per Hitzeschock transformiert (2.2.1.7). Daraufhin wurden die *E. coli*-Bakterien auf LB-Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Colony Screening mit den Primern pAPY301 und pAPY401 durchgeführt (2.2.1.11). Die Bakterienkolonien, bei denen nach der PCR eine Amplifikatgröße von ungefähr 440 bp detektiert werden konnte, wurden über Nacht in 4 ml LB-Kan bei 37°C und 200 UpM kultiviert. Nach einer Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (2.2.1.12) wurden zur Kontrolle ein Verdau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III und ein zweiter Verdau mit den Enzymen *Xho*I und *Acc*65I durchgeführt (2.2.1.16). Daraufhin wurden die inserierten DNA-Fragmente mit Hilfe der Primer M13 Reverse und M13 Forward sequenziert (2.2.1.18).

Zur Auswertung der Sequenzierung wurde ein Alignment mit der „*Anopheles stephensi* salivary apyrase mRNA, complete cds“-Sequenz (Identifikationsnummer AY162238.1) durchgeführt. Dabei wurden bei 7 der 410 Positionen unterschiedliche Nukleotide detektiert (vgl. 7.3). Bei einem Vergleich der entsprechenden Aminosäuresequenzen wurden hingegen keine Unterschiede festgestellt, so dass es sich bei den Variationen wahrscheinlich um Einzelnukleotid-Polymorphismen handelt, die in diesem Fall keine Auswirkung auf die Proteinsequenz haben. Diese Polymorphismen gehören zu einer Unterklasse der Sequenzvariationen, die Nukleotidaustausche, Deletionen und Insertionen von einzelnen Nukleotiden umfassen und in einer Population mit $\geq 1\%$ auftreten (Thomas *et al.*, 2011). Das hergestellte Plasmid wurde pAPY1441#1 genannt.

Im nächsten Klonierungsschritt wurde die Expressionskassette hergestellt. Dazu wurden zunächst das Plasmid pAPY1441#1 und der Klonierungsvektor pHANNIBAL mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III verdaut (2.2.1.16). Nach einer anschließenden Gelelektrophorese mit einem 1% (w/v) Agarosegel wurden sowohl die erwarteten Banden von pAPY1441#1 bei ungefähr 415 bp als auch von pHANNIBAL bei ungefähr 5800 bp mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey & Nagel) extrahiert (2.2.1.2). Als nächstes wurde mit der geschnittenen Apyrase-cDNA und dem linearisierten Plasmid pHANNIBAL eine Ligation durchgeführt (2.2.1.4). Der Ligationsansatz wurde benutzt, um kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes TOP10 per Hitzeschock zu transformieren (2.2.1.7). Nun wurden die Bakterien auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein Colony Screening mit den Primern pAPY301 und pAPY401 (2.2.1.11). Kolonien, die PCR-Produkte von ungefähr 440 bp aufwiesen, wurden über Nacht in 4 ml LB-Amp bei 37°C und 200 UpM kultiviert. Im Anschluss an eine Plasmidpräparation

mittels alkalischer Lyse (2.2.1.12) wurde ein Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *HindIII* durchgeführt (2.2.1.16). Als nächstes wurde das eingefügte cDNA-Fragment mit Hilfe der Primer pAPY501 und pAPY601 sequenziert (2.2.1.18). Dabei band der Primer pAPY501 strangaufwärts und der Primer pAPY601 strangabwärts zum inserierten Fragment im Plasmid-Rückgrat. Die Sequenzierung bestätigte die erwartete Insertion der Apyrase-cDNA in einer *antisense*-Orientierung. Das hergestellte Plasmid wurde pAPY8141#2 genannt.

Zur späteren Herstellung der hpRNA wurde als nächstes die Apyrase-cDNA in *sense*-Orientierung in das Plasmid pAPY8141#2 eingefügt. Dazu wurden die Plasmide pAPY1441#1 und pAPY8141#2 mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *Acc65I* verdaut (2.2.1.16). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch eine Gelelektrophorese mit einem 1% (w/v) Agarosegel. Daraufhin wurden die erwarteten Banden von pAPY1441#1 bei ungefähr 430 bp als auch von pAPY8141#2 bei ungefähr 6250 bp mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey & Nagel) extrahiert (2.2.1.2). Als nächstes wurde das geschnittene cDNA-Fragment in das linearisierte Plasmid pAPY8141#2 ligiert (2.2.1.4), um anschließend kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes TOP10 per Hitzeschock zu transformieren (2.2.1.7). Dann wurden die transformierten Bakterien zur Selektion auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einige der Kolonien in 4 ml LB-Amp überführt und über Nacht bei 37°C und 200 UpM kultiviert. Nach der Präparation der Plasmide mittels alkalischer Lyse (2.2.1.12) wurde ein Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *Acc65I* zur Identifikation von Bakterien durchgeführt (2.2.1.16), die das Konstrukt aufgenommen hatten. Daraufhin wurde das inserierte DNA-Fragment mit Hilfe der Primer pAPY701 und pAPY801 sequenziert (2.2.1.18). Dazu band der Primer pAPY701 strangaufwärts und der Primer pAPY801 strangabwärts zum inserierten Fragment im Plasmid-Rückgrat. Die Auswertung bestätigte den Einbau der Apyrase-cDNA in der *sense*-Orientierung, so dass die Expressionskassette fertiggestellt und das generierte Plasmid pAPY8141#2 genannt wurde.

Im letzten Klonierungsschritt wurde die Expressionskassette in den pflanzlichen Expressionsvektor pART27 kloniert. Dazu wurden die Plasmide pAPY8141#2 und pART27 mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut (2.2.1.16). Nach einer Gelelektrophorese mit einem 1% (w/v) Agarosegel wurde die Expressionskassette mit einer Größe von ungefähr 3800 bp und der linearisierte Vektor pART27 bei 11700 bp mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey & Nagel) extrahiert (2.2.1.2). Daraufhin wurde eine Ligation durchgeführt (2.2.1.4), um mit dem Ansatz kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α per Hitzeschock zu transformieren (2.2.1.7). Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Spec-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 28°C inkubiert. Nach einem durchgeführten Colony Screening mit den Primern pAPY301 und pAPY401 (2.2.1.11) wurden

die Kolonien, welche Amplifikate von ungefähr 440 bp aufwiesen, über Nacht in 4 ml LB-Spec bei 28°C und 200 UpM kultiviert. Im Anschluss an eine Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (2.2.1.12) erfolgten zwei unterschiedliche Kontrollverdaue mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *Acc65I* und einmal nur mit *NotI* (2.2.1.16). Nach einer Gelelektrophorese mit einem 1% (w/v) Agarosegel wurden die erwarteten Bandenmuster und damit die erfolgreiche Klonierung bestätigt. Der fertiggestellte, pflanzliche Expressionsvektor wurde pAPY7431#7 genannt.

Zur genetischen Veränderung der Tabakpflanzen wurden Agrobakterien des Stammes GV3101 mit dem binären Vektor pAPY7431#7 per Hitzeschock transformiert (2.2.1.10). Danach wurden die Bakterien auf LB-Rif-Gent-Spec-Platten ausgestrichen und zwei Tage lang bei 28°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Colony Screening mit den Primern pAPY301 und pAPY401 (2.2.1.11). Bakterienkolonien, die Amplifikate von ungefähr 440 bp aufwiesen, wurden über Nacht in 4 ml LB-Rif-Gent-Spec bei 28°C und 200 UpM kultiviert. Daraufhin wurde mit der Bakterienkultur pAPY7431#7-1 weitergearbeitet (3.1.4).

Eine Zusammenfassung der verschiedenen Klonierungsschritte ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt. Zur dauerhaften Lagerung der entsprechenden Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angelegt (2.2.1.17).

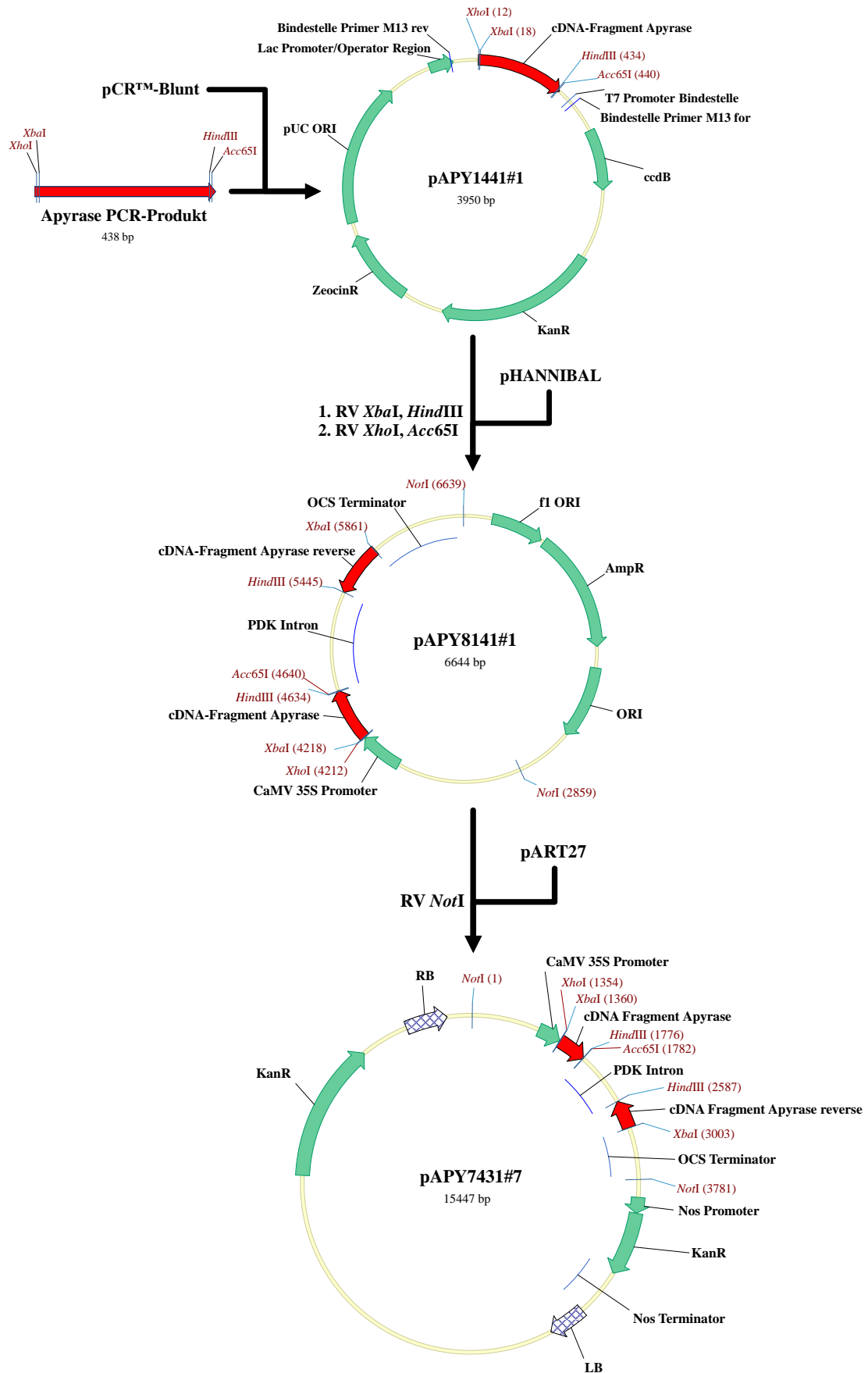


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Klonierung des pflanzlichen Expressionsvektors pAPY7431#7. Die Details zur Klonierung des Vektors pAPY7431#7 sind ausführlich im Text beschrieben.

3.1.3. *In silico* Analyse der hpRNA mit Hilfe des Programms si-Fi

Obwohl siRNAs hoch selektiv an ihre Ziel-mRNA binden, besteht immer die Gefahr, durch unspezifische Hybridisierungen mit anderen mRNAs unerwünschte Effekte durch RNA-Interferenz zu induzieren (Kola *et al.*, 2015). Daher wurden die ausgewählten 410 bp der Apyrase-cDNA, die zur pflanzlichen Herstellung der hpRNA (3.1.2) eingesetzt werden sollten, mit Hilfe des Programms si-Fi (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben) analysiert. Dadurch konnten Rückschlüsse auf die Spezifität zur Apyrase-mRNA und auf mögliche Effekte gegenüber der Expression anderer Gene in den Arten *Nicotiana tabacum* und *Anopheles stephensi* gezogen werden (2.2.3.7). Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1 *In silico* Analyse der generierten hpRNA zur Produktion in *Nicotiana tabacum* und zur Induzierung der RNA-Interferenz in *Anopheles stephensi*. Zur Effektivitätsbestimmung der hpRNA zur Herunterregulation der Expression des *apyrase*-Gens und zur Überprüfung auf mögliche unerwünschte Nebeneffekte wurden die 410 bp der eingesetzten Apyrase-cDNA mit Hilfe der Sequenz-Datenbanken von *Nicotiana tabacum* und *Anopheles stephensi* durch das Programm si-Fi analysiert. GenBank®-Nummer: Die GenBank® Nummern der Sequenzen, an welche die *in silico* generierten siRNAs binden. Alle Treffer: Anzahl der möglichen 21 Nukleotid langen siRNAs, welche mit der cDNA-Sequenz hybridisieren können. Effiziente Treffer: Anzahl der 21 Nukleotid langen siRNAs, welche die Kriterien für eine effiziente RNA-Interferenz erfüllen.

Organismus	GenBank®-Nummer	alle Treffer	effiziente Treffer
<i>Anopheles stephensi</i>	AY162238.1	273	117
<i>Anopheles stephensi</i>	GE468787.1	273	117
<i>Anopheles stephensi</i>	GE469447.1	123	58
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	0	0

Die Analyse der eingesetzten hpRNA-Sequenz zur posttranskriptionellen Inhibierung der *apyrase*-Expression zeigte keine unerwünschte Herunterregulation der Expression anderer Gene in den Organismen *Nicotiana tabacum* und *Anopheles stephensi*. Die GenBank®-Nummer AY162238.1 ist der Apyrase-mRNA von *Anopheles stephensi* zugeordnet. Bei den Identifikationsnummern GE468787.1 und GE469447.1 handelt es sich um *expressed sequence tags* der gleichen Apyrase-Sequenz. Auf Grund der 117 vorhergesagten unterschiedlichen siRNAs eignet sich die ausgewählte Sequenz von 410 bp zur Induzierung der RNA-Interferenz in *Anopheles stephensi* und zur Produktion der hpRNA in *Nicotiana tabacum*, ohne die Funktion anderer Gene in beiden Organismen zu beeinflussen.

3.1.4. Stabile Transformation von *Nicotiana tabacum* ‚Petit Havana‘ mit pAPY7431#7

Zur Herstellung stabil transformierter *Nicotiana tabacum* ‚Petit Havana‘-Pflanzen wurden zunächst Wildtyp-Samen sterilisiert und auf MS-Festmedium gegeben, um die Pflanzen unter sterilen Bedingung wachsen zu lassen (2.2.3.3). Anschließend erfolgte die stabile Transformation der Pflanzen mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers (2.2.3.1). Dazu wurden die Agrobakterien mit der Bezeichnung pAPY7431#7-1 verwendet, die das Plasmid pART27 mit der Expressionskassette zur pflanzlichen Generierung der hpRNA aufgenommen hatten (3.1.2). Die hpRNA sollte später zur posttranskriptionellen Inhibierung der *apyrase*-Expression durch RNA-Interferenz in *Anopheles stephensi*-Mücken verwendet werden (3.1.6). Zur Charakterisierung von vier transgenen Tabakpflanzen, bei denen es sich um zehn Wochen alte Exemplare handelte und die zuvor mittels Kanamycin selektiert worden waren, wurde diesen Blattmaterial entnommen. Anschließend wurde die DNA aus dem Pflanzenmaterial extrahiert (2.2.3.4) und mit Hilfe einer PCR unter Verwendung der Primer pAPY301 und pAPY401 untersucht (2.2.1.1), ob die Expressionskassette mit dem Gen zur Produktion der hpRNA erfolgreich in das pflanzliche Genom integriert worden war. Die Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

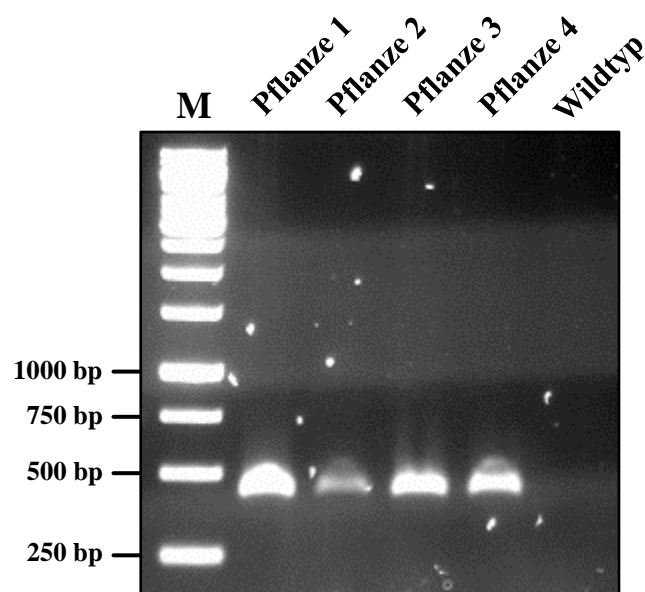


Abbildung 3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Geneinbaus in das pflanzliche Genom zur Produktion der hpRNA. Es wurden die PCR-Ansätze von fünf verschiedenen Pflanzen mittels eines 1% (w/v) Agarosegels in 1×TAE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde die extrahierte DNA aus einer Wildtyp-Pflanze verwendet. M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Bei allen vier Pflanzen wurden Banden bei der erwarteten Größe von 438 bp detektiert, so dass die Expressionskassette mit der Apyrase-cDNA erfolgreich in das pflanzliche Genom integriert worden

war. Die hohe Transformationseffizienz der *Nicotiana tabacum* ‚Petit Havana‘-Pflanzen ist damit zu erklären, dass die Bildung der T-DNA von der RB (*right border*)-Sequenz zur LB (*left border*)-Sequenz über einen 5′-3′-Mechanismus initiiert wird. Bei der Verwendung des Vektors pART27 sollte daher die Expressionskassette vor dem Resistenzgen gegen Kanamycin in das pflanzliche Genom transferiert werden. Dadurch enthalten mittels Kanamycin selektierte Pflanzen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auch das eingebaute Gen zur Produktion der hpRNA (Gleave, 1992).

Im nächsten Schritt wurde RNA aus dem Blattmaterial der vier Pflanzen extrahiert (2.2.3.5). Anschließend sollte überprüft werden, ob die eingebauten Gene auch exprimiert werden und die hpRNA nachgewiesen werden kann. Nach der Isolation der RNA wurde ein DNase I-Verdau zur Entfernung der genomischen DNA durchgeführt (2.2.1.14). Anschließend wurde die mit DNase I behandelte RNA als Matrize zur Erststrangsynthese durch eine Reverse Transkription (2.2.1.15) mit dem Primer pAPY222 verwendet. Die hergestellten Erststränge wurden daraufhin mittels PCR und den Primern pAPY111 und pAPY222 auf das Vorhandensein der Apyrase-Sequenz überprüft. Dabei binden die beiden Primer innerhalb der Apyrase-cDNA, die in den Expressionsvektor pART27 inseriert worden war (3.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

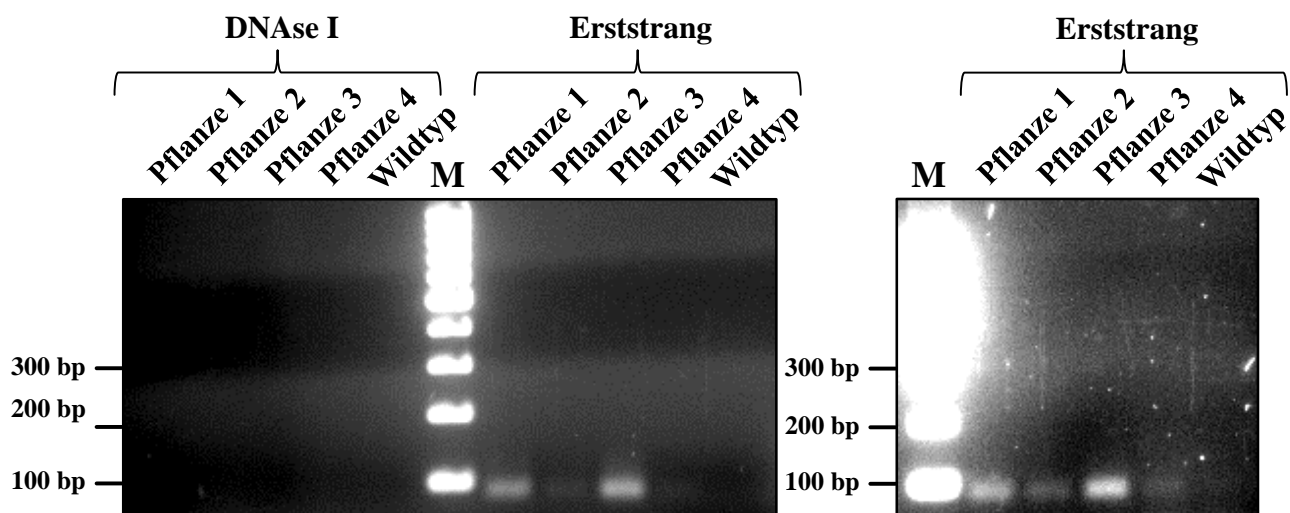


Abbildung 3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Detektion der hpRNA auf RNA-Ebene.

Es wurden PCR-Ansätze von vier verschiedenen Pflanzen mittels eines 1% (w/v) Agarosegels in 1×TAE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde die extrahierte RNA aus einer Wildtyp-Pflanze verwendet. Zur Kontrolle, ob in den mit DNase I behandelten RNA-Extrakten noch genomische DNA vorhanden war, wurden diese ebenfalls als Matrize für eine PCR verwendet. Auf der rechten Seite der Abbildung sind gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Ansätze dargestellt, die einer längeren Exposition durch UV-Licht ausgesetzt waren, als die auf dem linken Gelbild dargestellten Ansätze. M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Auf Grund der durchgeführten reversen Transkription mit anschließender PCR konnten die erwarteten Amplifikate der Apyrase-cDNA von 87 bp in allen vier Pflanzen erfolgreich nachgewiesen werden. In den Kontrollen, bei denen die mit DNase I behandelte RNA als Matrize verwendet worden war, konnten keine PCR-Produkte detektiert werden. Damit wurde gezeigt, dass die Erststränge nicht durch Kontamination von genomischer DNA entstanden sind, sondern dass die Amplifikate auf Grund der hpRNA generiert worden waren. Die unterschiedlichen Mengen der gelelektrophoretisch aufgetrennten, amplifizierten Erststrang-cDNAs könnten auf Grund von verschieden stark ausgeprägten Degradierungszuständen der extrahierten RNA entstanden sein. Des Weiteren kann die T-DNA bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in transkriptionell aktive oder inaktive Bereiche des Genoms integriert werden. Dadurch können die Transgene auch unterschiedlich stark exprimiert werden (Gelvin, 2003). Außerdem kann die Anzahl der integrierten Transgene variieren und dadurch die Menge an produzierten mRNAs beeinflussen (Gelvin, 2003, Zhang *et al.*, 2008).

Die pflanzlich hergestellte hpRNA zeigte bei einem Experiment von Wesley *et al* (2001) in fast 100% der transgenen Pflanzen eine konsistente, posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression durch RNA-Interferenz. Dabei wurde ebenfalls das Plasmid pHANNIBAL zur Generierung der genetisch veränderten Pflanzen verwendet. So konnte bei einigen transformierten Pflanzen beinahe ein vollständiges Abschalten der Genfunktion erreicht werden (Wesley *et al.*, 2001). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass während des Spleißens die beiden Arme der hpRNA innerhalb des Spleißosoms eine Duplexstruktur ausbilden und sich nicht erst innerhalb der Zelle finden müssen (Wesley *et al.*, 2001). Daher scheint sich das in dieser Arbeit verwendete System zur Herstellung von hpRNA zur Induzierung der RNA-Interferenz zu eignen.

Bevor die extrahierten und charakterisierten RNA-Fractionen für ein Fütterungsexperiment mit weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken verwendet wurden, erfolgte eine Qualitätsüberprüfung der RNA bezüglich ihres Degradierungsgrades mittels gelelektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden Agarosegel (2.2.1.3). Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

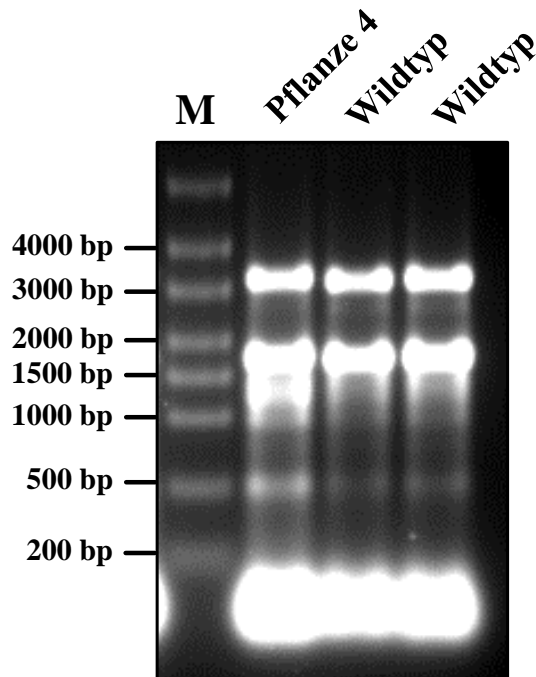


Abbildung 3.6 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Extraktionen aus Tabakpflanzen. Zur Untersuchung der RNA-Qualität wurden je 5 µg der extrahierten RNA aus den Tabakpflanzen, die für ein Fütterungsversuch mit weiblichen *Anopheles*-Mücken verwendet werden sollten, mittels eines denaturierenden Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. M: RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Extrakte, die für ein Fütterungsexperiment mit weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken zur Herunterregulation der *apyrase*-Expression verwendet werden sollten, zeigten keine Degradierung. Daher eignete sich sowohl die RNA, welche die hpRNA mit der Apyrase-cDNA enthielt, als auch RNA von normalen Tabakpflanzen zur Applikation an die Mücken (3.1.6).

3.1.5. Fütterungsversuch der weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken mit Saccharoselösungen

Zur Fütterung der weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken wurde zunächst eine Methode zur Applikation der RNA-Proben entwickelt. Dazu wurden 16 Tage alte, weibliche Mücken in kleine Käfige überführt und für einen Tag nicht gefüttert. Daraufhin wurden in einem Käfig 300 µl einer 10% (w/v) Saccharoselösung, die mit roter Lebensmittelfarbe versetzt worden war, und zur Kontrolle in einem zweiten Käfig 300 µl einer 10% (w/v) Saccharoselösung jeweils auf einem Stück Parafilm zur Nahrung angeboten. Nach zwei Tagen wurden erneut je 300 µl zur Nahrungsaufnahme bereitgestellt. Nach insgesamt vier Tagen wurde das Ergebnis des Fütterungsversuches anhand der rot gefärbten Abdomen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 und in Tabelle 3.2 dargestellt.

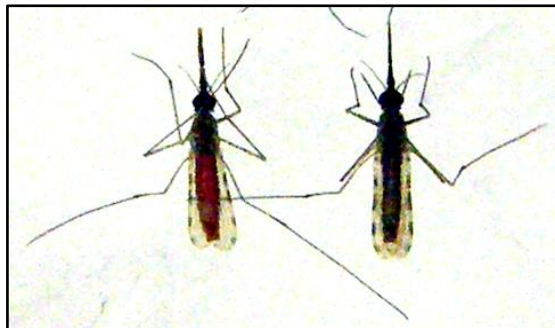


Abbildung 3.7 Darstellung der weiblichen *Anopheles*-Mücken nach der Nahrungsaufnahme von 10% (w/v) Saccharoselösungen. Auf der linken Seite ist eine Mücke nach der Nahrungsaufnahme einer 10% (w/v) Saccharoselösung abgebildet, die mit roter Lebensmittelfarbe versetzt worden war. Die rechte Seite zeigt eine *Anopheles*-Mücke, der nur eine 10% (w/v) Saccharoselösung zur Nahrung angeboten worden war.

In Abbildung 3.7 ist das rot gefärbte Abdomen deutlich von der Mücke zu erkennen, die sich vier Tage lang von einer 10% (w/v) Saccharoselösung mit roter Lebensmittelfarbe ernährt hat. Ausgehend von der Färbung wurde eine Auswertung des Fütterungsversuches durchgeführt, die in Tabelle 3.2 dargestellt ist.

Tabelle 3.2 Auswertung des Fütterungsversuches von weiblichen *Anopheles*-Mücken. Im Käfig 1 bekamen die Mücken eine 10% (w/v) Saccharoselösung und im Käfig 2 eine 10% (w/v) Saccharoselösung zur Nahrung angeboten, die mit roter Lebensmittelfarbe versetzt worden war. Nach vier Tagen wurde die Aufnahme der Saccharoselösungen anhand der rot gefärbten Abdomen ausgewertet.

	Käfig 1	Käfig 2
Gesamtanzahl der Mücken	91	76
überlebende Mücken nach 4 Tagen	63	65
Überlebensrate	69%	85%
rotes Abdomen	0 (0%)	61 (94%)

Aufgrund der rot gefärbten Abdomen mit einem Anteil von 94% bei den überlebenden Mücken ist diese Methode zur Applikation einer 10% (w/v) Saccharoselösung geeignet. Auch scheint die Lebensmittelfarbe keinen negativen Einfluss auf die Sterblichkeitsrate der *Anopheles*-Mücken zu haben. Des Weiteren wurden bereits Larven des Falters *Epiphyas postvittana* zur Induzierung von RNA-Interferenz erfolgreich mit dsRNA gefüttert, die in einer Saccharoselösung gelöst war (Turner *et al.*, 2006). Auch erfolgte die orale Applikation von dsRNA an Bienen zur posttranskriptionellen Inhibierung eines ATP-Transporter-Gens des Bienenparasiten *Nosema ceranae* mit Hilfe von Saccharoselösungen (Paldi *et al.*, 2010). Durch die Fütterung von adulten Mücken der Art *Aedes aegypti* mit einer Zuckerlösung, die mit spezifischer dsRNA gegen eine V-ATPase-mRNA versetzt war, konnte eine posttranskriptionelle Inhibierung der Expression des Ziel-Gens nachgewiesen werden. Dabei war eine signifikante Herunterregulation bis zu 48 Stunden nach der Nahrungsaufnahme nachweisbar (Coy *et al.*, 2012). Zur späteren Applikation wurden daher die RNA-Proben entsprechend mit Saccharose versetzt und den *Anopheles*-Mücken zur Nahrung angeboten.

3.1.6. Auswertung des Fütterungsexperiments zur Herunterregulierung der *apyrase*-Expression

Um zu überprüfen, ob die pflanzlich produzierte hpRNA zur posttranskriptionellen Inhibierung der *apyrase*-Expression in weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken verwendet werden kann, wurde ein viertägiges Fütterungsexperiment durchgeführt. Dazu wurde einer Gruppe von weiblichen Mücken die Gesamt-RNA mit der enthaltenen hpRNA aus der Pflanze 4 zur Nahrung angeboten (vgl. 3.1.4). Einer Kontrollgruppe wurde die Gesamt-RNA aus Wildtyp-*Nicotiana tabacum* ‚Petit Havana‘-Pflanzen und einer zweiten Kontrollgruppe eine 10% (w/v) Saccharoselösung appliziert. Die RNA-Proben wurden den Mücken ebenfalls in jeweils 10% (w/v) Saccharoselösungen angeboten (vgl. 3.1.5). Vor der Durchführung des Experiments wurden die weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken einen Tag lang

nicht gefüttert. Danach wurden den Mücken 300 µl der entsprechenden 10% (w/v) Saccharoselösungen zur Nahrung angeboten. Nach den ersten beiden Tagen wurden erneut 300 µl der jeweiligen Nahrungslösungen zur Nahrungsaufnahme bereitgestellt. Die Konzentrationen der applizierten RNA-Lösungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.3 Übersicht über die Gesamt-RNA-Konzentrationen in den applizierten 10% (w/v) Saccharoselösungen. In den ersten beiden Tagen des Fütterungsexperiments wurden drei weiblichen *Anopheles stephensi*-Gruppen jeweils 300 µl einer Nahrungslösung zur Verfügung gestellt. In den beiden darauffolgenden Tagen wurden erneut 300 µl von frischen Lösungen zur Nahrung angeboten. Sowohl die RNA-Proben als auch das Wasser wurden den Mücken jeweils mit 10% (w/v) Saccharoselösungen appliziert. hpRNA: pflanzliche Gesamt-RNA mit hpRNA. WTRNA: pflanzliche Gesamt-RNA aus einer Wildtyp-Pflanze. Wasser: Applikation von einer 10% (w/v) Saccharoselösung ohne enthaltene RNA.

Applikation	hpRNA	WTRNA	Wasser
Tag 1-2	973 ng/µl	692 ng/µl	-
Tag 2-4	63 ng/µl	789 ng/µl	-

In den ersten zwei Tagen wurde eine möglichst hohe Konzentration der Gesamt-RNA-Lösung mit der hpRNA appliziert, da schon frühzeitig ein RNAi-Effekt induziert werden sollte. Die Applikation der WTRNA diente zur Kontrolle, ob die Gesamt-RNA aus Wildtyp-Tabakpflanzen einen Einfluss auf die Expression des *apyrase*-Gens in den *Anopheles*-Mücken haben könnte. In Tabelle 3.4 ist eine Übersicht über die Anzahl der verwendeten Mücken und deren Überlebensrate dargestellt.

Tabelle 3.4 Gesamtanzahl der weiblichen *Anopheles*-Mücken während eines Fütterungsexperiments mit hpRNA, WTRNA und Wasser. Den Mücken wurden entweder eine hpRNA-Lösung, eine WTRNA-Lösung oder Wasser über einen Zeitraum von vier Tagen zur Nahrung angeboten. Dabei wurden die Proben jeweils in einer 10% (w/v) Saccharoselösung appliziert. hpRNA: pflanzliche Gesamt-RNA mit hpRNA. WTRNA: pflanzliche Gesamt-RNA aus einer Wildtyp-Pflanze. Wasser: Applikation einer 10% (w/v) Saccharoselösung ohne enthaltene RNA.

Applikation	hpRNA	WTRNA	Wasser
Gesamtanzahl der Mücken	74	62	54
überlebende Mücken nach 4 Tagen	48	45	40
Überlebensrate	64%	73%	74%

Die Überlebensrate der Mücken ist vergleichbar mit dem Ergebnis des Fütterungsversuches unter Verwendung von angefärbten 10% (w/v) Saccharoselösungen (3.1.5). Daher wurde vier Tage nach der Applikation der unterschiedlichen Proben die Gesamt-RNA aus den Köpfen der überlebenden,

weiblichen *Anopheles*-Mücken mit dem GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) extrahiert (2.2.6.2). Als nächstes erfolgte ein DNase I-Verdau zur Entfernung möglicher Kontaminationen durch genomische DNA (2.2.1.14). Anschließend wurde eine Erststrangsynthese durch eine reverse Transkription (2.2.1.15) mit 300 ng extrahierter und mit DNase I behandelte Gesamt-RNA und oligo(dT)₁₈-Primern (pODT201) durchgeführt. Als interne Kontrolle zur Normalisierung der Expression des *apyrase*-Gens wurde die Expression des Haushaltsgens *ribosomal protein S7* (RPS7) (GenBank®-Nummer: AF539918.2) verwendet, welches auch anderen Forschungsgruppen zur Normalisierung dient (Wang *et al.*, 2013). Anschließend wurden PCRs zur qualitativen Überprüfung der generierten Erststränge und der extrahierten RNA durchgeführt. Zur Amplifikation der hergestellten Erststränge des cDNA-Fragments des *rps7*-Gens wurden die Primer pRT111 und pRT222 und zur Vervielfältigung des cDNA-Abschnitts des *apyrase*-Gens wurden die Primer pAPY333 und pAPY444 eingesetzt. Eine schematische Übersicht der amplifizierten cDNA-Regionen ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

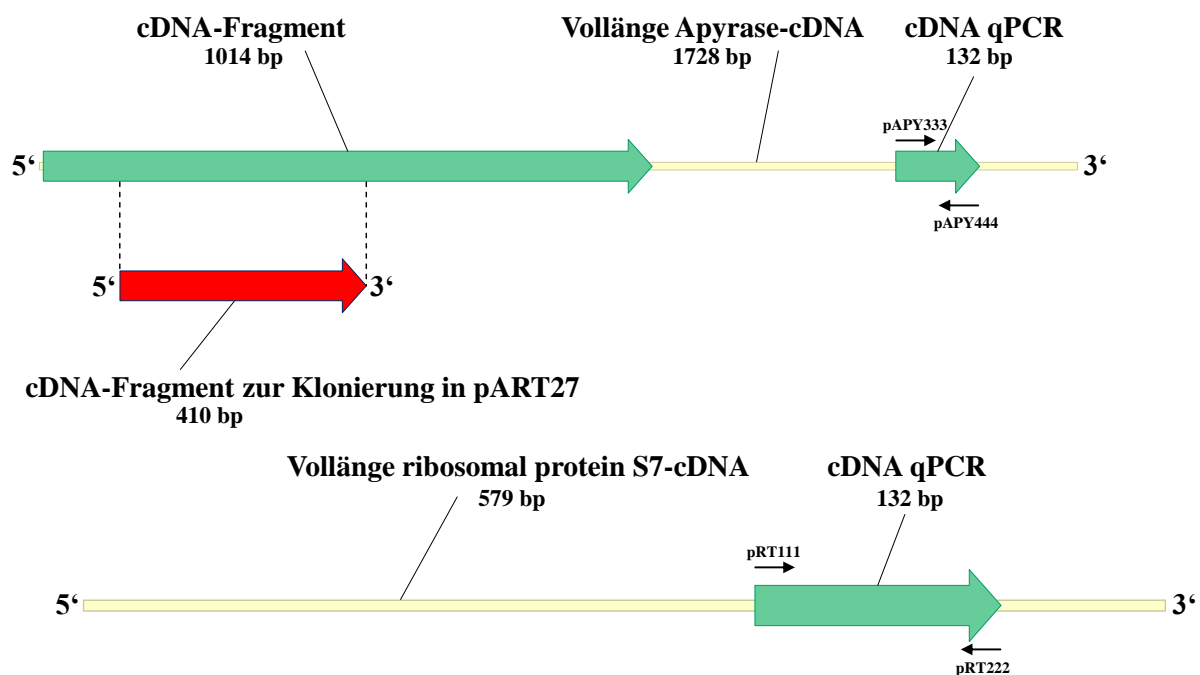


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der amplifizierten cDNA-Regionen. Die vorgesehenen cDNA-Fragmente zur Analyse mittels quantitativer Real-time-PCR sind mit der Bezeichnung „cDNA qPCR“ markiert.

Die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

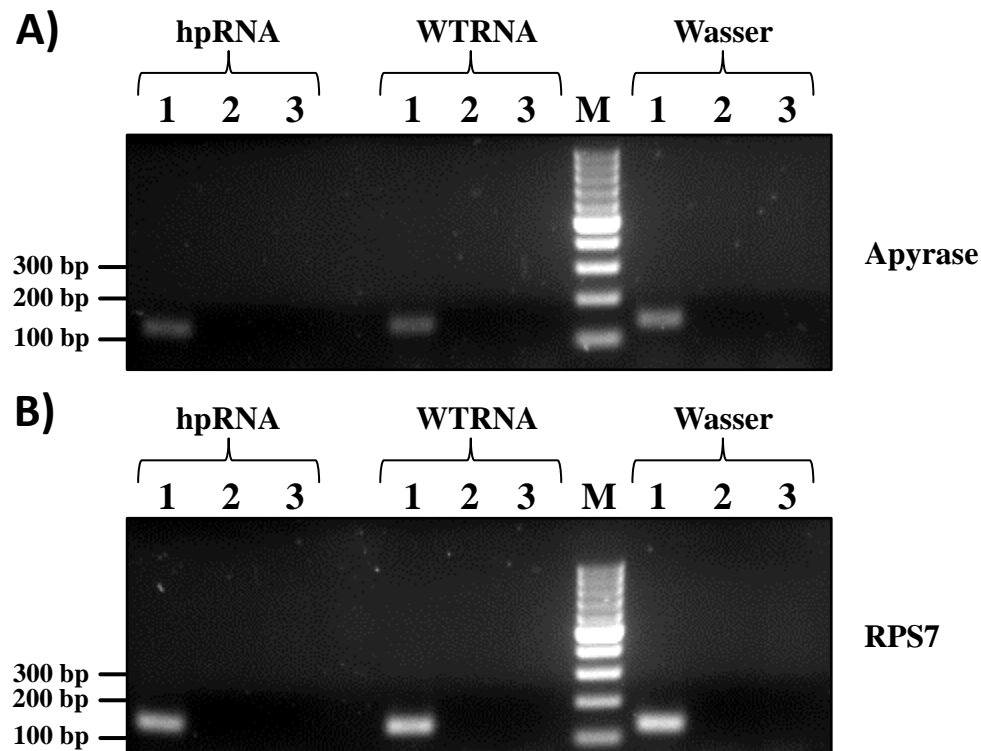


Abbildung 3.9 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur qualitativen Überprüfung der generierten Erststränge und der extrahierten RNA aus weiblichen Mückenköpfen. Zur qualitativen Überprüfung der extrahierten RNA wurden die Produkte der Erststrangsynthese, die mit DNase I behandelte RNA und die isolierte Gesamt-RNA mittels PCR analysiert. Dazu wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines 1% (w/v) Agarosegels in 1×TAE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. A) PCR-Ansätze zur Detektion der Apyrase-cDNA. B) PCR-Ansätze zur Detektion der RPS7-cDNA. 1: Verwendung von 1 µl der Erststrangsynthese als Matrize. 2: Verwendung von 1 µl der mit DNase I behandelten RNA als Matrize. 3: Verwendung von 1 µl der isolierten Gesamt-RNA als Matrize. M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Den Mückengruppen wurden zuvor folgende Lösungen appliziert: hpRNA: pflanzliche Gesamt-RNA mit hpRNA. WTRNA: pflanzliche Gesamt-RNA aus einer Wildtyp-Pflanze. Wasser: Applikation einer 10% (w/v) Saccharoselösung ohne enthaltene RNA.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zeigte, dass weder die extrahierte Gesamt-RNA noch die mit DNase I behandelte RNA mit genomischer DNA kontaminiert waren. Auch konnten die mRNAs zur Bildung der Apyrase und des Proteins RPS7 nachgewiesen werden. Daher wurden die Produkte der Erststrangsynthese mittels quantitativer Real-time-PCR (2.2.1.19) daraufhin untersucht, ob die pflanzliche Gesamt-RNA mit spezifischer hpRNA zur posttranskriptionellen Inhibierung der *apyrase*-Expression in weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken verwendet werden kann. Die Amplifikation der cDNA des Haushaltsgens *rps7* erfolgte mit den Primern pRT111 und pRT222, die Vervielfältigung der cDNA des *apyrase*-Gens wurde mit den Primern pAPY333 und pAPY444 durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet (Livak und

Schmittgen, 2001). Dazu wurde die Expression des *apyrase*-Gens mit der Expression des *ribosomal protein S7* (RPS7)-Gens normalisiert. Anschließend wurde die normalisierte Genexpression mit Hilfe der normalisierten Expression des *apyrase*-Gens in den Mücken kalibriert, welche nur eine 10% (w/v) Saccharoselösung als Nahrungsquelle angeboten bekommen hatten. Die Ergebnisse der Analyse mittels quantitativer Real-time-PCR sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

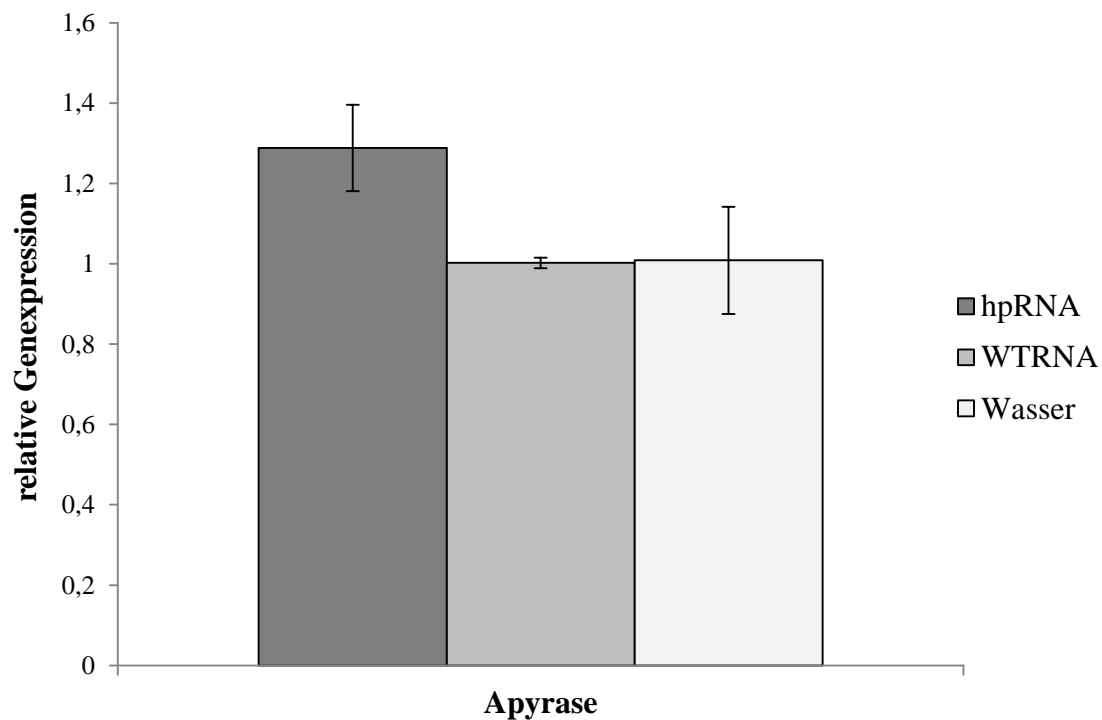


Abbildung 3.10 Auswertung des Fütterungsexperiments zur posttranskriptionellen Inhibierung des *apyrase*-Gens mittels quantitativer Real-time-PCR. Zur Herunterregulierung der Expression des *apyrase*-Gens durch RNA-Interferenz wurde einer Gruppe von weiblichen Mücken die Gesamt-RNA mit enthaltener hpRNA zur Nahrung angeboten (hpRNA). Des Weiteren bekam eine zweite Gruppe die Gesamt-RNA aus Wildtyp-*Nicotiana tabacum* ‚Petit Havana‘-Pflanzen (WTRNA) appliziert. Beide RNA-Proben wurden den Mücken mit jeweils einer 10% (w/v) Saccharoselösung angeboten. Zur Kalibrierung der Genexpression wurde einer dritten Gruppe Wasser appliziert (Wasser), das ebenfalls mit Saccharose versetzt war. Im Balkendiagramm sind die Standardabweichungen der technischen Triplikate dargestellt.

Die Ergebnisse des Fütterungsexperiments zeigten keine Expressionsreduzierung des *apyrase*-Gens auf Grund der Applikation pflanzlicher Gesamt-RNA mit enthaltener hpRNA. Zur Überprüfung dieser Aussage wurde daher das Ergebnis mit den Resultaten von zwei weiteren quantitativen Real-time-PCRs in Abbildung 3.11 zusammengefasst.

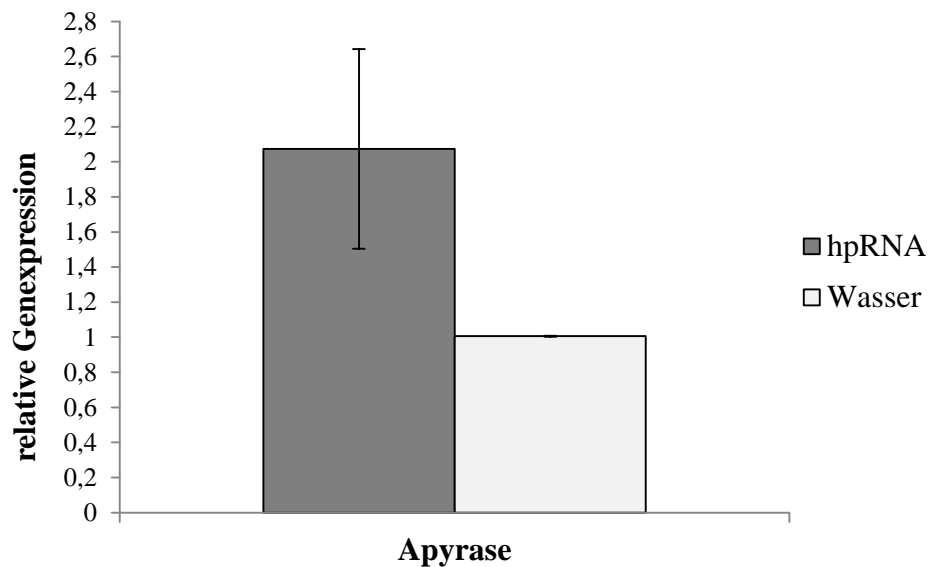


Abbildung 3.11 Auswertung des Fütterungsexperiments zur posttranskriptionellen Inhibierung des *apyrase*-Gens mittels drei quantitativer Real-time-PCRs. Zur Verifizierung des Ergebnisses der ersten qPCR (vgl. Abbildung 3.10) erfolgte eine Zusammenfassung mit den Resultaten von zwei weiteren quantitativen Real-time-PCRs. Zur posttranskriptionellen Inhibierung des *apyrase*-Gens wurde eine Mückengruppe mit der Gesamt-RNA und der darin enthaltenen hpRNA gefüttert (hpRNA). Die extrahierte RNA wurde den Mücken in einer 10% (w/v) Saccharoselösung angeboten. Zur Kalibrierung der Genexpression wurde einer weiteren Gruppe Wasser appliziert (Wasser), das ebenfalls mit Saccharose versetzt war. Im Balkendiagramm sind die Standardabweichungen der normalisierten Ergebnisse der drei durchgeführten quantitativen Real-time-PCRs dargestellt.

Auch die zwei weiteren durchgeführten quantitativen Real-time-PCRs bestätigten die Aussage, dass die Expression des *apyrase*-Gens nicht durch die Fütterung mit einem Extrakt aus pflanzlicher Gesamt-RNA mit sequenzspezifischer hpRNA inhibiert werden konnte.

Die orale Verabreichung von dsRNA stellt eine effiziente Methode zur Induzierung der RNA-Interferenz in Insekten dar (Kola *et al.*, 2015). Die einfache Methode Insekten über die Nahrung dsRNA zu applizieren, hat aber den Nachteil, dass RNA nur eine geringe Stabilität aufweist (Kola *et al.*, 2015) und die Dosis der dsRNA hoch sein muss, um einen messbaren Effekt auf die Genregulation des Ziel-Gens durch RNA-Interferenz zu erhalten (Ivashuta *et al.*, 2015). Die Stabilität von RNA wird maßgeblich durch die ubiquitäre Verbreitung von RNasen beeinflusst. Diese Enzyme kommen in Eukaryoten, Prokaryoten und sogar in einigen Viren vor. Da die RNasen auch von Mikroorganismen produziert werden, können sie so über die Luft verbreitet werden. Des Weiteren weisen RNasen eine Aktivität in einem pH-Bereich von 2-10 auf und sind in Lösungen mit einer Konzentration von bis zu 8 M Harnstoff und bei extremen Temperaturen von bis zu 80°C noch stabil (Aranda *et al.*, 2012).

Die Effizienz der künstlich induzierten RNA-Interferenz ist bei Mücken abhängig vom Gewebe- und Zelltyp, in dem die Genregulation erfolgen soll. So sind der Mitteldarm und Hämocyten, die als Phagozyten eine wichtige Rolle im Immunsystem von Insekten einnehmen, geeignet für eine RNAi-abhängige Inhibierung der Genexpression. Aktive Gene in den Speicheldrüsen benötigen jedoch eine viel höhere Dosis an dsRNA, um eine posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression zu induzieren (Barnard *et al.*, 2012). Ausbleibende inhibitorische Effekte auf die Genregulation können auch am Entwicklungsstadium der Mücken und an der Region liegen, an der die siRNA an die Ziel-mRNA binden soll (Coy *et al.*, 2012).

Um zum Beispiel die Genexpression zur Produktion einer V-ATPase in Mücken der Art *Aedes aegypti* mittels RNA-Interferenz zu inhibieren, wurde den Insekten eine Zuckerlösung mit einer Konzentration von 1000 ng/μl entsprechender dsRNA zur Nahrungsaufnahme angeboten. Nach 12, 24 und 48 Stunden wurden Proben entnommen und analysiert. Dadurch wurde festgestellt, dass zu allen Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Genexpression um den Faktor 2.5 im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand (Coy *et al.*, 2012). Des Weiteren wurde durch die einmalige Injektion von 2500 ng dsRNA in das Hämocoel von *Anopheles gambiae* die Expression des für das Speicheldrüsenprotein Saglin codierenden Gens für mindestens sechs Tage durch RNA-Interferenz herunterreguliert. Dadurch wurde die Sporozoitenanzahl von infizierten Mücken um bis zu 97% im Vergleich zu einer Kontrollgruppe reduziert, bei der dsRNA zur Regulierung einer *gfp*-Expression injiziert wurde (Ghosh *et al.*, 2009). Nach der Injektion von 200 oder 400 ng dsRNA wurde hingegen nur eine ineffektive inhibitorische Wirkung auf die Expression von *saglin* festgestellt (Ghosh *et al.*, 2009). Auch wurden 1000 ng sequenzspezifischer dsRNA zur Injektion benötigt, um die Produktion des Speicheldrüsenproteins CSPBP mittels RNA-Interferenz zu inhibieren. Dadurch wurde die Transkription soweit herunterreguliert, dass den Plasmodien die Invasion der Speicheldrüsen maßgeblich erschwert wurde (Wang *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu kann die Herunterregulierung der Genexpression in Mitteldarmzellen und Hämocyten schon durch eine Injektion von 140 ng sequenzspezifischer dsRNA in die Hämolymphe erreicht werden (Boisson *et al.*, 2006).

Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint die Herunterregulierung von Genen, die in den Speicheldrüsen exprimiert werden, durch RNA-Interferenz technisch schwierig zu sein (Wang *et al.*, 2013). Ein möglicher Grund für die fehlende Reduktion der Expression des *apyrase*-Gens ist die geringe Konzentration der applizierten hpRNA. Da auch nur ein sehr geringer prozentualer Anteil der gesamten RNA in einer Zelle aus codierender mRNA besteht (Mattick, 2001; Mattick, 2003), wird auch der Anteil von hpRNA an der extrahierten Gesamt-RNA aus den transgenen Pflanzen sehr klein sein. So wurde eine hpRNA zur posttranskriptionellen Inhibierung des *nc123*-Gens, welches für einen ATP-Transporter des Bienenparasiten *Nosema ceranae* codiert, mit Hilfe von stabil transformierten

Nicotiana tabacum ‚Petit Havana‘-Pflanzen produziert. Dabei wurde zur Generierung der spezifischen hpRNA ebenfalls der Expressionsvektor pART27 verwendet. Eine absolute Quantifizierung mittels RT-qPCR ergab einen Anteil von $0.06 \pm 0.03\%$ an der Gesamt-RNA der Tabakpflanzen (Fräbel, 2011). Auch wenn die dsRNA in Chloroplasten gebildet wird, erfolgt nur eine Akkumulation von bis zu 0.4% anteilig an der gesamten zellulären RNA (Zhang *et al.*, 2015). Daher wird es auch nicht möglich sein, auf Grund einer höheren Ausbeute an pflanzlicher Gesamt-RNA und deren oraler Applikation an weibliche *Anopheles stephensi*-Mücken eine posttranskriptionelle Inhibierung der Expression von Genen zu erreichen, die verantwortlich für die Produktion von Speicheldrüsenproteinen sind. Die benötigten Konzentrationen von spezifischer hpRNA zur posttranskriptionellen Regulation von Genen in den Speicheldrüsen scheinen nicht mit Hilfe von transgenen Pflanzen produzierbar zu sein.

Ein weiterer Grund für die schwierige Regulation von Genen in den Speicheldrüsen von Mücken mittels RNA-Interferenz ist, dass die Gene für RNA-abhängige RNA-Polymerasen nicht in den Genomen von Insekten detektierbar sind. Daher werden die RNAi-Signale nicht amplifiziert und die RNA-Interferenz bleibt auf die Zellen beschränkt, welche die dsRNA aufgenommen haben. So ist es zum Beispiel für die Induzierung des RNAi-Mechanismus in Darmzellen wichtig, dass die Insekten kontinuierlich dsRNA aufnehmen (Zhang *et al.*, 2015; Barnard *et al.*, 2012). Daher wird der Transport der pflanzlich produzierten und über die Nahrung aufgenommenen hpRNAs in die Speicheldrüsen der Mücken maßgeblich erschwert. Obwohl die Aktivität der Gene *dicer1*, *dicer2*, *ago2* und *ago3*, welche für die RNA-Interferenz in *Anopheles gambiae* essentiell sind, bereits erfolgreich in deren Speicheldrüsen nachgewiesen wurde, fällt ihre Expression jedoch geringer aus als in anderen Geweben (Boisson *et al.*, 2006). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass dadurch die Regulierung von Genen mittels der RNAi-Maschinerie in den Speicheldrüsen von *Anopheles stephensi* zusätzlich erschwert wird.

Obwohl die Forschung bei der Entwicklung von RNAi-Pflanzen immer weitere Fortschritte macht, ist es bisher noch nicht gelungen, eine vor Fraßschädlingen komplett geschützte transgene Pflanze zu generieren. Der RNAi-Mechanismus der Pflanzen verhindert eine Akkumulation von dsRNA, da diese durch Spaltung in siRNAs mit einer Länge von 21 Nukleotiden abgebaut wird. Die kleinen RNAs haben jedoch nur einen geringen Effekt auf die Inhibierung der posttranskriptionellen Genexpression, wenn sie an Insekten verfüttert werden. Daher mindert der schnelle, pflanzliche Umsatz von dsRNA zu siRNA die Effizienz von transgenen RNAi-Pflanzen als Strategie gegen Fraßschäden durch Insekten (Zhang *et al.*, 2015). Zhang *et al.* generierten daher transgene Kartoffelpflanzen, welche sequenzspezifische dsRNA zu einer β -Actin-Sequenz des Kartoffelkäfers in Chloroplasten produzierten. Da die Plastiden auf Grund ihres prokaryotischen Ursprungs keinen RNAi-Mechanismus

aufweisen, konnte die dsRNA in den Organellen akkumulieren. Ernährten sich Kartoffelkäferlarven nun vom Blattmaterial der RNAi-Pflanzen, starben alle Larven innerhalb von fünf Tagen. Wurde den Insekten hingegen Blattmaterial von Pflanzen verfüttert, welche die gleiche dsRNA in den Zellkernen herstellten, wurde die Sterblichkeitsrate der Larven nicht weiter beeinflusst (Zhang *et al.*, 2015). Des Weiteren wurde bei einem Fütterungsexperiment mit Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera*) nachgewiesen, dass die pflanzlich produzierte dsRNA im Darmlumen stabil war und dass die Prozessierung in 21 Nukleotid lange siRNAs innerhalb Darmzellen erfolgte (Ivashuta *et al.*, 2015). Dabei wurden jedoch nur lange dsRNAs von den Darmzellen aufgenommen, wohingegen kurze siRNAs nicht in die Zellen gelangten. In den Darmzellen der Insekten wurden die dsRNAs dann hauptsächlich in 21 Nukleotid lange siRNAs durch die endogene RNAi-Maschinerie prozessiert. Dennoch wurden auch einige der dsRNAs in andere Gewebe transportiert, so dass es auch möglich ist, Ziel-Gene in anderen Organen der Insekten zu regulieren (Ivashuta *et al.*, 2015). Da die siRNAs instabil sind und auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften nicht durch Diffusion Zellmembranen überwinden können (Kanasty *et al.*, 2013), sind die prozessierten siRNAs in den pflanzlichen Gesamt-RNA-Extraktionen nicht zur Inhibierung der Genexpression in Insekten geeignet. Auch ist die Detektion von dsRNA, die im Zellkern von transgenen Pflanzenzellen produziert wird, auf Grund der Prozessierung zu siRNAs durch die endogene RNAi-Maschinerie nur durch eine Beladung mit sehr hohen Mengen an RNA oder durch eine Überbelichtung mittels Northern Blot nachweisbar (Zhang *et al.*, 2015). Daher scheint die Produktion von dsRNA in Pflanzen nicht geeignet zu sein, um über den Nektar eine posttranskriptionelle Inhibierung der Genexpression in den Speicheldrüsen von *Anopheles*-Mücken zu induzieren.

Die Bildung der dsRNA kann in Pflanzen optimiert werden, indem spezifische Promotoren, Transkriptionsverstärker und Suppressoren eingesetzt werden (Kola *et al.*, 2015). So besteht die Möglichkeit, transgene Pflanzen zur Produktion von vorwiegend langen dsRNAs zu generieren, indem einige der Gene für die Produktion der Dicer-Like-Enzyme (DLC) ausgeschaltet werden. Dadurch beinhalten die veränderten Pflanzen wesentlich mehr sequenzspezifische dsRNA als die Wildtyp-Varianten (Mao *et al.*, 2007). Auch durch die Produktion von viralen Suppressoren der RNAi-Maschinerie würde der Gehalt an hpRNA in transgenen Pflanzen erhöht werden. Dadurch würden die generierten Pflanzen jedoch auch anfälliger gegen virale Infektionen werden, so dass deren Einsatz in der freien Natur mit einer geringeren Vitalität verbunden wäre (Gelvin, 2003).

Da die Produktion von hpRNA in transgenen Pflanzen und deren Applikation an weibliche *Anopheles*-Mücken keine Inhibierung der Expression des *apyrase*-Gens induzierte, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine weitere alternative Strategie gegen Malaria mit Hilfe transgener Pflanzen untersucht (3.2).

3.2. Teil 2: Nanobody-basierte Strategie gegen Malaria

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich der Einsatz von Einzeldomänenantikörpern zur Reduzierung der Malariaübertragung mit Hilfe von transgenen Pflanzen realisieren lässt. Bei Nanobodies handelt es sich um Antikörperfragmente von Schwerekettenantikörpern, die bei Tieren der Familie der Kamelartigen (Camelidae) und bei einigen Vertretern der Klasse der Knorpelfische (Chondrichthyes) vorkommen (Wesolowski *et al.*, 2009). Dieser Teil der Arbeit basiert auf den Beobachtungen von Simon *et al.* (2013), die gezeigt haben, dass während der Fütterung von weiblichen *Anopheles stephensi*-Mücken mit infiziertem, menschlichem Blut Faktor H mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers funktionell inaktiviert werden kann. Dadurch wurde die Entwicklung der Plasmodien im Mitteldarm inhibiert, so dass die Mücken die Malariaerreger nicht auf Menschen übertragen können (Simon *et al.*, 2013). Um den möglichen Einsatz von Nanobodies als Maßnahme gegen Malaria zu untersuchen, wurden zunächst Einzeldomänenantikörper mit einer hohen Affinität zu Faktor H hergestellt und charakterisiert. In Abbildung 3.12 ist die Generierung von Nanobodies schematisch dargestellt.

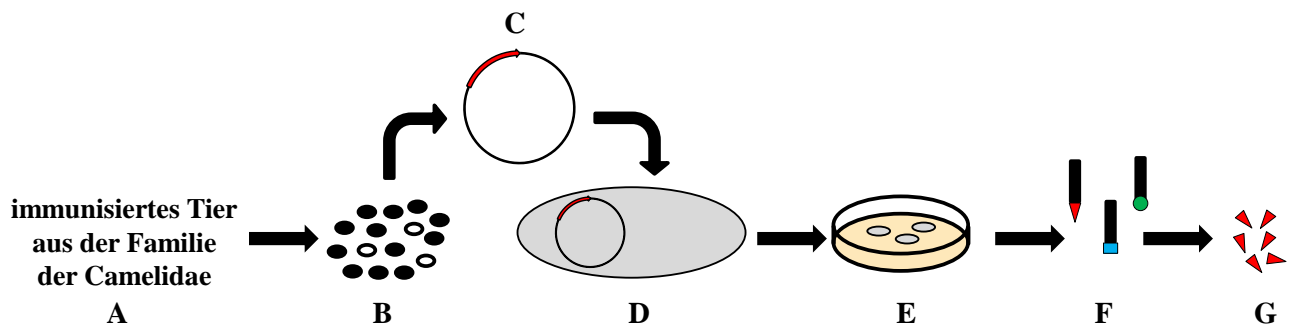


Abbildung 3.12 Schematische Übersicht über die Selektion und Klonierung von VHH-Sequenzen aus einem immunisierten Vertreter der Familie der Camelidae (in Anlehnung an Muyldermans, 2001; Carmen und Jermutus, 2002). Nachfolgend sind die nötigen Schritte zur Generierung von Nanobodies beschrieben. A: Immunisierung eines Vertreters der Familie der Camelidae. B: Isolierung der Lymphozyten, Extraktion von RNA und cDNA-Synthese. C: Amplifizierung der VHH-Sequenzen und Klonierung in ein Phagemid. D: Transformation von *E. coli*-Bakterien. E: Herstellung einer Phagen-Bibliothek. F: Panning. G: Produktion und Charakterisierung der Nanobodies.

Anschließend wurden die produzierten Einzeldomänenantikörper durch ein *in vivo* Fütterungsexperiment auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht. Daraufhin wurde die pflanzliche Produktion eines Fusionsproteins analysiert, welches aus einem N-terminalen Anti-Faktor H-Nanobody und einem C-terminalen Fc-Teil eines humanen IgG1-Antikörpers bestand.

3.2.1. Ergebnisse zur Herstellung der Phagen-Bibliotheken

Für die Identifizierung und Charakterisierung von Nanobodies, die mit hoher Affinität an Faktor H binden sollen, ist die Qualität der verwendeten Phagen-Bibliothek entscheidend. Zur Herstellung der Bibliothek wurden die peripheren Blutlymphozyten eines immunisierten Alpaka/Lama-Hybrids verwendet. Auf Grund der leichteren Zugänglichkeit und der wiederholt möglichen Blutentnahme ist die Verwendung der Blutlymphozyten der Benutzung von Lymphozyten aus der Milz oder den Lymphknoten vorzuziehen (Nduati *et al.*, 2010). Nach einer Immunantwort des Tieres enthalten die Lymphozyten mRNA-Stränge, die für Faktor H bindende VHHs codieren. Die Verwendung einer Phagen-Bibliothek aus immunisierten Tieren hat den Vorteil, dass hochaffine Nanobodies zum Zielprotein effizienter identifiziert werden können (Smith *et al.*, 2005). Durch das Antigen im Körper des Tieres wird die Produktion von spezifischen Schwerekettenantikörpern ausgelöst, so dass durch die Kombination mit der somatischen Hypermutation Immunglobuline mit einer hohen Affinität zum Antigen gebildet werden (Hoogenboom, 2005). Durch Generierung einer cDNA-Bibliothek wurde die Matrize für zwei ineinander verschachtelte PCRs geschaffen, welche zur Klonierung der Nanobody-cDNA in das Phagemid pHEN4 dienen.

3.2.1.1. PCR Amplifikation der VHH-Sequenzen

Zur Amplifikation der Nanobody-Sequenzen wurde eine *Nested* PCR (2.2.1.1) durchgeführt. Dazu wurden zuerst die cDNA-Sequenzen der VHHs von denen der variablen Domänen der schweren Ketten konventioneller IgG-Antikörper mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese getrennt. In Abbildung 3.13 ist eine Übersicht der Hybridisierungsorte der Primer CALL001, CALL002, Primer 38 und Primer A6E dargestellt.

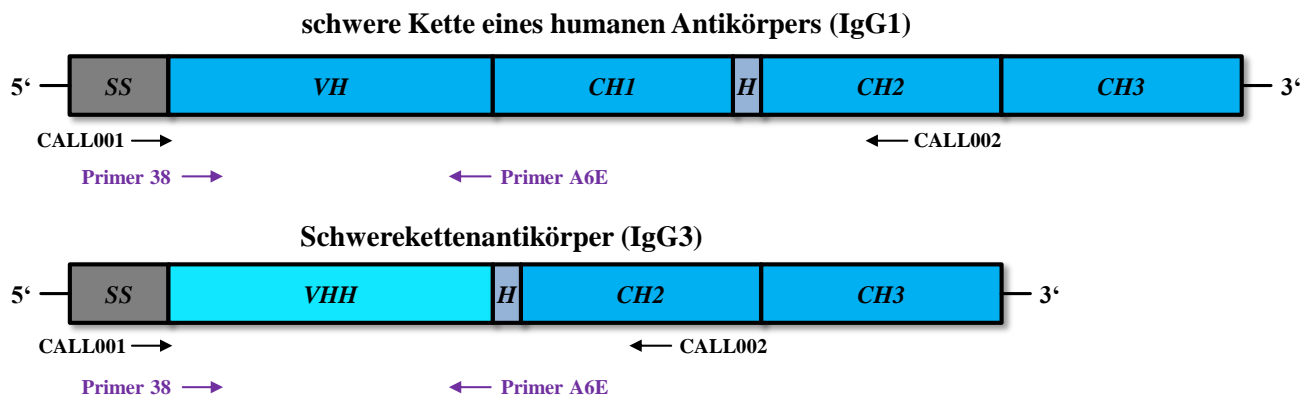


Abbildung 3.13 Darstellung der Hybridisierungsorte für die Primer CALL001, CALL002, Primer 38 und Primer A6E (in Anlehnung an Pardon *et al.*, 2014). Für jeden Primer wurde der Hybridisierungsort schematisch in Pfeilform dargestellt. H: Hinge-Region. CH: *Constant domain of heavy chain*. VH: *Variable domain of heavy chain*. VHH: *Variable domain of camelid heavy chain antibody*. FR: *Framework region*. CDR: *Complementarity determining region*. SS: Signalsequenz für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum während der Proteinbiosynthese.

Die Verwendung der Primer CALL001 und CALL002 (vgl. Tabelle 2.2) erzeugte zwei unterschiedliche Amplikons mit den Größen von ca. 700 bp (VHH-hinge-CH2-Region der HCAs) und von ca. 900-1000 bp (VH-CH1-hinge-CH2-Region der konventionellen IgG-Antikörper). Die optimale Konzentration der cDNA zur Verwendung als Matrize wurde durch mehrere PCRs mit unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen ermittelt. Ausgehend von den Vorversuchen wurde eine PCR zu Trennung der beiden cDNA-Sequenzen durchgeführt. Die Ergebnisse der anschließenden Gelelektrophorese sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

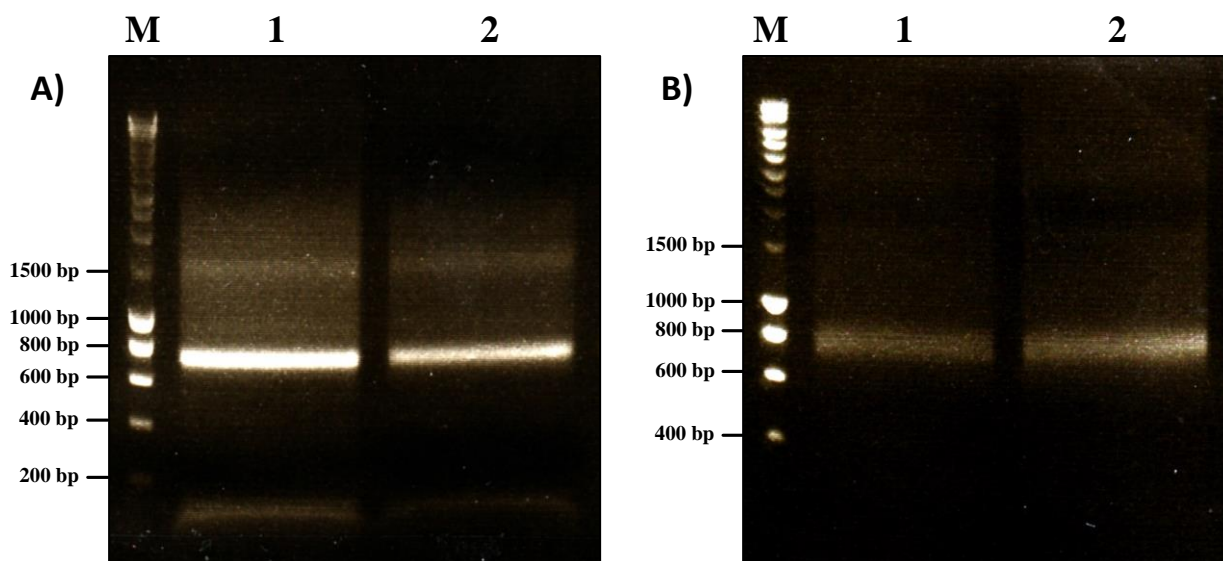


Abbildung 3.14 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate zur Trennung der VHH-cDNA von der VH-cDNA konventioneller IgG1-Antikörper. Es wurden je 200 µl der PCR-Ansätze mittels eines 1% (w/v) Agarosegels in 1×TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: SmartLadder (Eurogentec). A) Spur 1-2: Amplifikate der Trennungs-PCR B) Spur 1-2: Amplifikate der Trennungs-PCR.

Wie Abbildung 3.14 zeigt, war die PCR zur Amplifikation der VHH-Sequenzen erfolgreich. Die Ansätze wiesen die erwarteten Banden der VHH-hinge-CH₂-Region der HCAs bei einer Größe von ca. 700 bp auf. Die Banden mit einer Größe zwischen 900 und 1000 bp waren nur schwach vorhanden. Ein Grund für die geringe Amplifikation könnte sein, dass das mit Faktor H immunisierte Tier (2.2.4.1) aus einer Kreuzung der Arten *Lama glama* und *Vicugna pacos* hervorgegangen ist. Bei den Vertretern der Camelidae haben Schwerekettenantikörper einen 30 bis 70%-igen Anteil an allen zirkulierenden Immunglobulinen (Rissiek *et al.*, 2014). Durch die Hybridisierung könnte das Tier prozentual weniger konventionelle IgG-Antikörper aufweisen. Des Weiteren werden die Primer zur Amplifikation der cDNA bei den Arten *Lama glama* und *Vicugna pacos* empfohlen, da der Primer CALL001 an eine größtenteils konservierte Region der Leader-Signal-Sequenz und der Primer CALL002 an eine konservierte Region in allen IgG-Isotypen bindet (Pardon *et al.* 2014). Anschließend wurden die Banden mit einer Größe von ca. 700 bp aus dem Gel durch das GenElute™ PCR-Clean Up Kit (Sigma-Aldrich) extrahiert und als Matrize für eine Scale-up-PCR (2.2.4.2) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden mit einem Gesamtvolumen von 1250 µl durchgeführt. Die Ergebnisse der analytischen Gelelektrophorese sind in Abbildung 3.15 zu sehen.

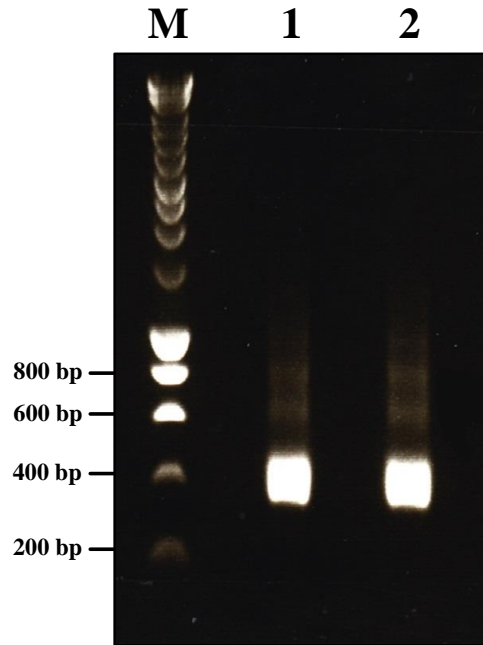


Abbildung 3.15 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der Scale-up-PCR zur Amplifizierung der VHH-Sequenzen. Es wurden je 10 µl der PCR-Ansätze mittels eines 1% (w/v) Agarosegels in 1×TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: SmartLadder (Eurogentec). Spur 1 und 2: Amplifikate der Scale-up-PCR.

Anhand Abbildung 3.15 ist zu erkennen, dass die Scale-up-PCR der VHH-Sequenzen erfolgreich war. Die Amplifikate besaßen die erwartete Bandengröße von ca. 400 bp, so dass eine Aufreinigung der PCR-Ansätze mittels des GenElute[™] PCR-Clean Up Kits (Sigma-Aldrich) erfolgte.

3.2.1.2. Charakterisierung der hergestellten Phagen-Bibliotheken

Zur Charakterisierung der zwei hergestellten Phagen-Bibliotheken wurde zum einen die Bibliotheksgröße und zum anderen die Transformationseffizienz der TG1-Zellen bestimmt (2.2.4.4). Die Ligation der amplifizierten VHH-Sequenzen erfolgte über die angefügten Schnittstellen *Pst*I und *Not*I (2.2.4.2) in das Phagemid pHEN4. Das entsprechende Konstrukt ist schematisch in Abbildung 3.16 dargestellt.

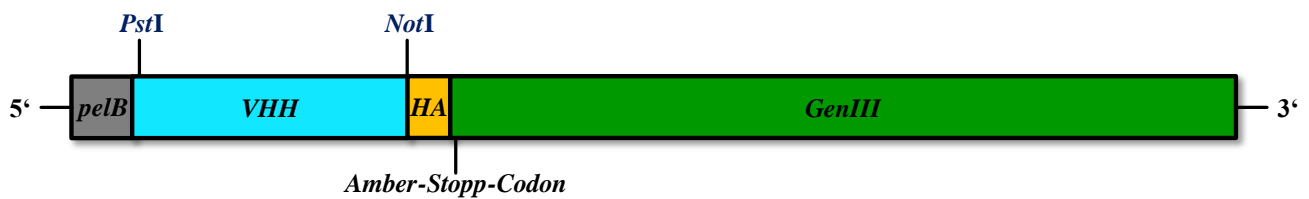


Abbildung 3.16 Schematische Darstellung des VHH-pIII-Fusionsproteins zur Verwendung im Panning. Mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *PstI* und *NotI* wurden die VHH-Sequenzen in das Phagemid pHEN4 kloniert. Am 3'-Ende der Nanobody-Sequenz befand sich die Sequenz eines HA-Tags, das als Epitop zur immunologischen Detektion des rekombinanten Proteins verwendet wurde. Das Amber-Stopp-Codon wird in TG1-Bakterien unterdrückt und führte so zur Fusion des Nanobodies mit dem Protein III (Qi *et al.*, 2012). Am 5'-Ende des Konstrukts befand sich eine *pelB*-Leader-Sequenz zum Transport des Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum. Anschließend wurde die Singalsequenz dort durch eine Signalpeptidase abgespalten (Choi und Lee, 2004).

Die zur Herstellung der beiden Phagen-Bibliotheken verwendeten Plasmidmengen und das Volumen der transformierten TG1-Zellen sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5 Parameter bei der Herstellung der zwei Phagen-Bibliotheken. Bei den Plasmidmengen handelt es sich um die eingesetzte Menge an Ligationsprodukten (2.2.4.3) in Nanogramm. Das angegebene Volumen der TG1-Zellen bezieht sich auf die transformierten Bakterien.

	Phagen-Bibliothek 1	Phagen-Bibliothek 2
Plasmidmenge	618 ng	4186 ng
Volumen TG1-Zellen	1 ml	0.7 ml

Bei den ausplattierten Bakterien zur Herstellung der Bibliotheken wurde ein dichter Bakterienrasen festgestellt. Es konnten jedoch keine Kolonien von TG1-Zellen entdeckt werden, die der Elektroporation ohne Ligationsansatz ausgesetzt waren. Damit wurde sichergestellt, dass die elektrokompenten Bakterien frei von Verunreinigungen durch andere Plasmide waren.

Die Bestimmung der Bibliotheksgröße erfolgte durch eine Berechnung anhand der ausgezählten Einzelkolonien transformierter TG1-Zellen, die zuvor in unterschiedlichen Verdünnungen in jeweils dreifacher Ausführung auf LB-Amp-Glu-Platten ausgestrichen worden waren (2.2.4.4). Dabei wurde angenommen, dass jeder Phage nur eine TG1-Zelle infiziert. Die Bakterienzelle erhielt dadurch eine Ampicillinresistenz und bildete auf entsprechendem Selektionsmedium eine Kolonie. So wurde für die Phagen-Bibliothek 1 eine Größe von 2.4×10^7 Zellen und für die Phagen-Bibliothek 2 eine Größe von 1.25×10^8 Zellen berechnet. Die Transformationseffizienz wurde durch ein Colony Screening der transformierten, verdünnten und auf LB-Amp-Glu-Platten ausgestrichenen TG1-Zellen bestimmt.

Dadurch sollte ermittelt werden, wie hoch der Anteil der Bakterien ist, die einen pHEN4-Vektor mit einer Nanobody-cDNA aufgenommen hatten. Dabei wurden die Primer RP und GIII (vgl. Tabelle 2.2) verwendet. Bei einer inserierten VHH-Sequenz wurden Amplifikate von ungefähr 700 bp und bei einem pHEN4-Vektor ohne Insert von ungefähr 340 bp erwartet. Die Transformationseffizienz wurde ermittelt, indem die Anzahl der Kolonien mit einem nachgewiesenen VHH-Insert durch die Gesamtanzahl der untersuchten Kolonien geteilt wurde. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Colony Screenings dargestellt.

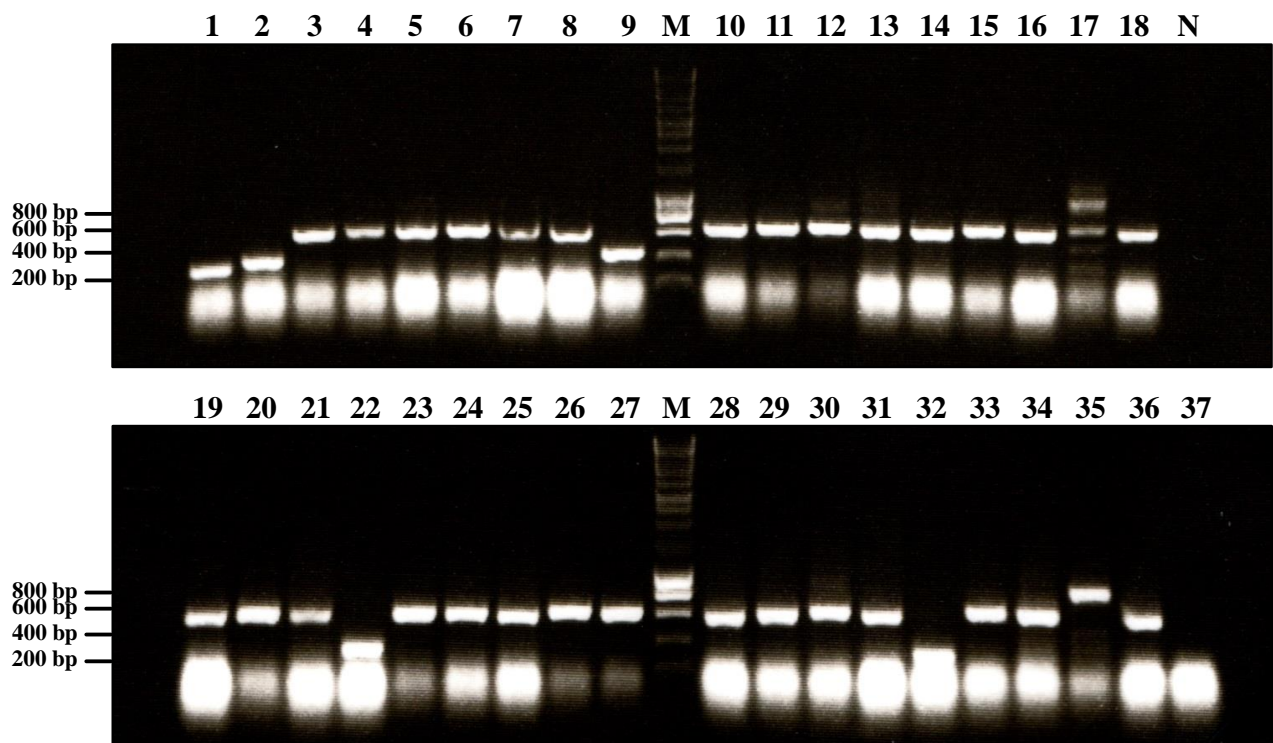


Abbildung 3.17 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate des Colony Screenings zur Bestimmung der Transformationseffizienz der Phagen-Bibliothek 1. Es wurden 37 Einzelkolonien auf VHH-Sequenzen, welche in den pHEN4-Vektor inseriert wurden, untersucht. Die PCR-Produkte wurden mittels eines 1% (w/v) Agarosegels in 1×TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: SmartLadder (Eurogentec). N: Negativkontrolle. Spur 1 bis 37: Amplifikate der untersuchten Einzelkolonien.

Bei der Herstellung der Phagen-Bibliothek 1 wurde bei 30 von 37 überprüften Kolonien ein PCR-Produkt mit ca. 700 bp identifiziert, so dass eine Transformationseffizienz von 81% erreicht wurde.

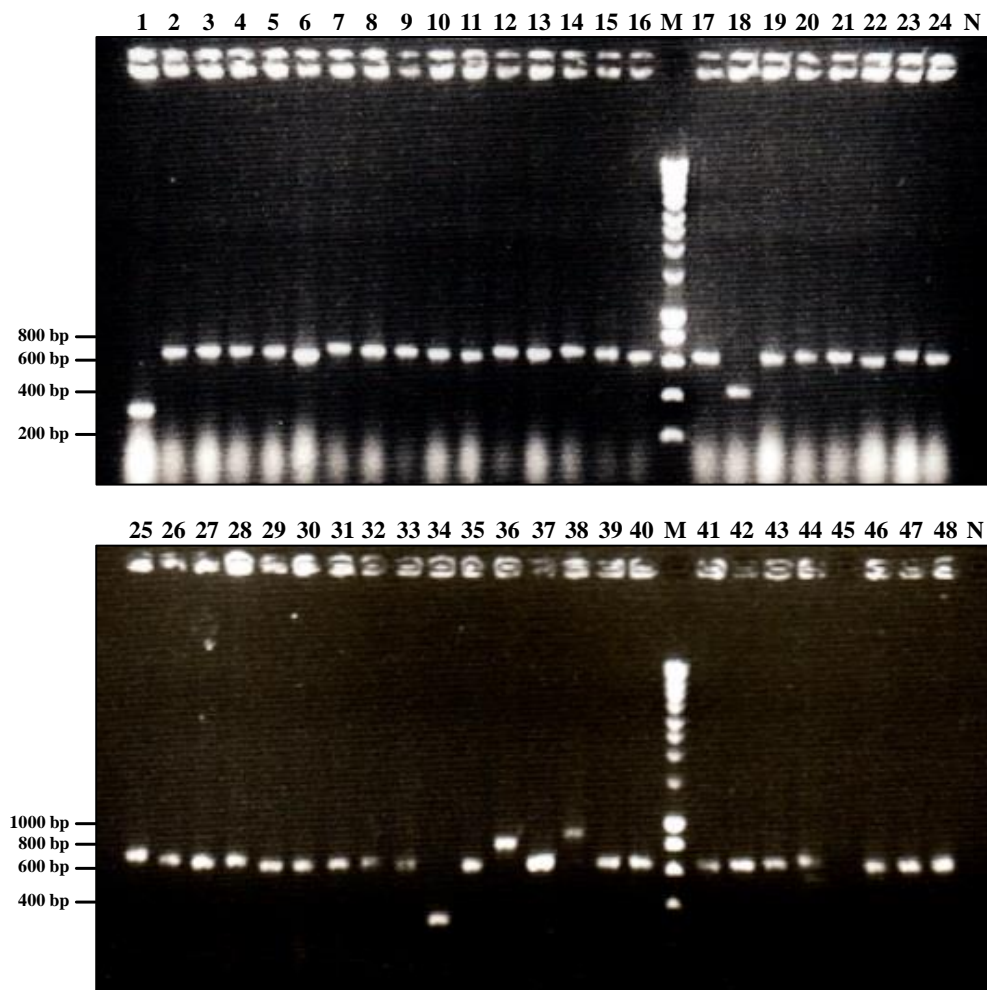


Abbildung 3.18 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate des Colony Screenings zur Bestimmung der Transformationseffizienz der Phagen-Bibliothek 2. Es wurden 48 Einzelkolonien auf VHH-Sequenzen, die in einen pHEN4-Vektor inseriert wurden, untersucht. Die PCR-Produkte wurden mittels eines 1% (w/v) Agarosegels in 1×TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: SmartLadder (Eurogentec). N: Negativkontrolle. Spur 1 bis 48: Amplifikate der untersuchten Einzelkolonien.

Bei der Phagen-Bibliothek 2 wurden bei 42 von insgesamt 48 untersuchten Kolonien PCR-Produkte mit der Größe von ca. 700 bp nachgewiesen. Damit weist die Bibliothek eine Transformationseffizienz von 88% auf.

Die Qualitätsbewertung beider Phagen-Bibliotheken erfolgte durch einen Vergleich mit Literaturwerten (vgl. Tabelle 3.6). Zur Herstellung der spezifischen Nanobodies sollte die Größe einer Phagen-Bibliothek zwischen 10^6 und 10^8 Zellen und der Anteil an Einzelkolonien, die den pHEN4-Vektor mit einer inserierten VHH-Sequenz aufgenommen hatten, bei über 75% liegen (Ghassabeh *et al.*, 2010).

Tabelle 3.6 Zusammenfassung der Charakterisierung der zwei Phagen-Bibliotheken. Die angegebene Richtlinie wurde der Publikation „Isolation of Antigen-Specific Nanobodies.“ von Ghassabeh *et al.* (2010) entnommen.

	Phagen-Bibliothek 1	Phagen-Bibliothek 2	Richtlinie
BibliotheksgroÙe	2.4×10^7	1.3×10^8	$10^6 - 10^8$
Transformationseffizienz	81%	88%	>75%

Durch den Vergleich mit der Richtlinie wurde gezeigt, dass zwei qualitativ hochwertige Phagen-Bibliotheken zur Generierung von Nanobodies gegen Faktor H hergestellt wurden.

Ein Grund für die bessere Qualität der Phagen-Bibliothek 2 könnte sein, dass ein erneuter Aufreinigungsschritt des Ligationsansatzes (2.2.4.3) mit dem Kit GenElute™ PCR-Clean Up Kit (Sigma-Aldrich) durchgeführt wurde. Dadurch waren weniger Salze in der Lösung vorhanden, welche die Transformationseffizienz einer Elektroporation negativ beeinflussen können (Wu *et al.*, 2010). Auch wurde bei der Transformation der TG1-Zellen eine größere Anzahl von Plasmiden eingesetzt (vgl. Tabelle 3.5), so dass die Transformationswahrscheinlichkeit einer TG1-Zelle zusätzlich stieg (Wu *et al.*, 2010). Als weiteres Kriterium zur Charakterisierung einer Bibliothek hätte eine Sequenzierung der Phagemide von zufällig ausgewählten Klonen durchgeführt werden können, da diese Methode Hinweise auf die Diversität, das Vorhandensein von Stopp-Codons und auf Verschiebungen von Leserahmen liefert (Carmen und Jermutus, 2002). Als nächstes wurden mit Hilfe der Phagen-Bibliothek 1 Nanobodies gegen Faktor H selektiert.

3.2.2. Identifikation und Produktion von Anti-Faktor H-Nanobodies

Zur Identifikation von Anti-Faktor H-Nanobodies wurden mit Hilfe der hergestellten Phagen-Bibliothek 1 mehrere Panningrunden durchgeführt. Anschließend wurden affine Binder durch einen PE-ELISA selektiert, bei dem der periplasmatische Extrakt mit den produzierten VHH-pIII-Fusionsproteinen auf die Interaktion mit immobilisiertem Faktor H untersucht wurde. Nachdem ausgewählte VHH-Sequenzen jeweils in den Expressionsvektor pHEN6(c) kloniert wurden, erfolgte eine Produktion und Aufreinigung der Anti-Faktor H-Nanobodies. Nach einer Charakterisierung durch einen ELISA und durch Bio-Layer-Interferometrie wurden die Einzeldomänenantikörper in einem *in vivo* Fütterungsexperiment auf ihre Wirksamkeit zur Inhibierung der Plasmodienentwicklung im Mitteldarm der Mücke eingesetzt.

3.2.2.1. Auswertung der Panningrunden

Zur Selektion von Phagen, die Nanobodies gegen Faktor H auf ihrer Oberfläche präsentieren, wurden drei Panningrunden durchgeführt. Dabei wurde die Anreicherung der Phagen anhand der ausgezählten Einzelkolonien berechnet (2.2.5.2). In den ausgestrichenen Kontrollen wurden keine Kolonien festgestellt, so dass eine Kontamination der verwendeten TG1-Zellen ausgeschlossen werden konnte. In Abbildung 3.19 ist die Anzahl der eluierten Phagen nach jeder Panningrunde aufgezeigt. Dazu wurden die Phagen aus den Kavitäten verglichen, die entweder mit dem Antigen oder PBS beschichtet wurden (Stratmann und Kang, 2005). Die PBS-Kontrolle diente zur Bestimmung der Anzahl von Phagen, die unspezifisch an die Oberfläche der Kavität oder gegen Bestandteile der Blockierungslösung gebunden hatten.

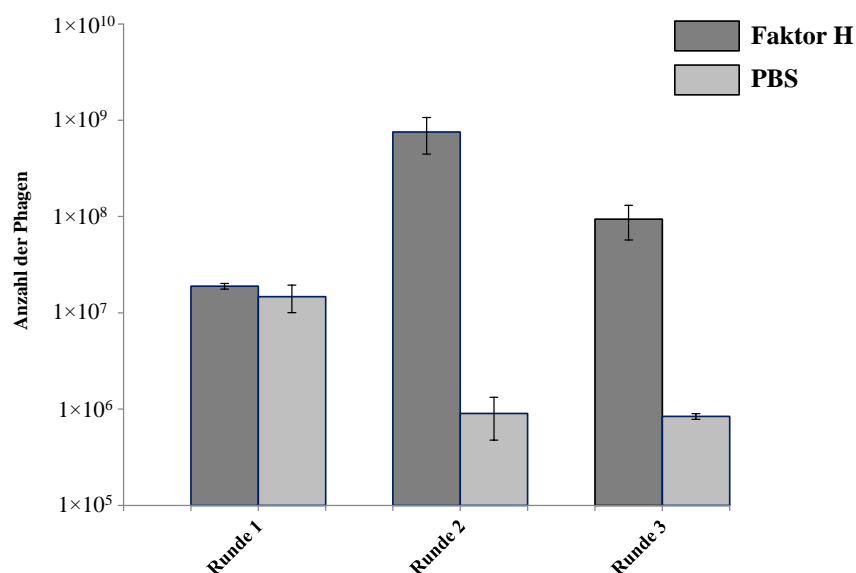


Abbildung 3.19 Anzahl der eluierten Phagen. Nach jeder Panningrunde wurden die gebundenen Phagen sowohl aus den Kavitäten, die vorab mit Faktor H inkubiert wurden, als auch aus den Kavitäten, welche mit PBS gefüllt waren, eluiert. Die Anzahl der Phagen wurde anhand der ausplattierten Einzelkolonien berechnet. In dem Balkendiagramm sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

Nach der zweiten und dritten Panningrunde wurden deutlich mehr Phagen aus den Kavitäten mit Faktor H als aus den mit PBS beschichteten Vertiefungen eluiert. Das zeigte eine Selektion und Anreicherung von Phagen, die auf ihrer Oberfläche Nanobodies gegen Faktor H präsentieren. Nach der dritten Panningrunde wurden im Vergleich zur zweiten jedoch weniger Phagen aus den mit Faktor H beschichteten Kavitäten eluiert. Das könnte daran liegen, dass zur Inkubation nur 4.8×10^9 statt 1×10^{11} Phagen eingesetzt wurden (vgl. Tabelle 3.7). Dadurch waren auch weniger spezifische Binder für

Faktor H vorhanden, so dass auch eine geringere Ausbeute erzielt wurde. Um die Anzahl der unspezifischen Binder zu verringern, wurde während der dritten Panningrunde anstelle einer 2% (w/v) Magermilchsuspension der „Protein-Free (PBS) Blocking Buffer“ (Life Technologies) verwendet. Durch die Änderung der Matrix sollten Nanobodies entfernt werden, die an Proteine des Magermilchpulvers gebunden hatten (Verheesen und Laeremans, 2012). Um eine höhere Ausbeute zu erhalten, hätten die Phagen vor der Zugabe in die Kavitäten mit der eingesetzten Blockierungslösung inkubiert werden können. Dadurch würden Phagen an Bestandteile in der Lösung binden und nicht unspezifisch an immobilisierte Antigene. Die Waschschrte würden dann eine effizientere Entfernung der unspezifischen Binder ermöglichen (Verheesen und Laeremans, 2012).

Als nächstes wurde die Anreicherung der Phagen überprüft, die in die Kavität mit Faktor H gegeben wurden. Dazu wurde für jede Panningrunde die Anzahl der eluierten Phagen durch die Anzahl der eingesetzten Phagen dividiert (Wang, Yi *et al.*, 2005). Die Auswertung der Anreicherung ist in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7 Übersicht über die Anreicherung der Phagen, welche in die Kavität mit Faktor H gegeben wurden. Die Anzahl der eingesetzten Phagen wurde durch eine photometrische Messung ermittelt, die Anzahl der eluierten Phagen wurde anhand der infizierten und ausplattierten TG1-Zellen berechnet (2.2.5.2).

Panningrunde	Phagen (eingesetzt)	Phagen (eluiert)	Anreicherung
1	1×10^{11}	1.89×10^7	1.89×10^{-4}
2	1×10^{11}	7.55×10^8	7.55×10^{-3}
3	4.8×10^9	9.4×10^7	1.96×10^{-2}

Das Verhältnis der eluierten Phagen zu den Phagen, die für die entsprechende Panningrunde eingesetzt wurden, erhöhte sich um mehr als das 100fache. Dieser Anstieg von 1.89×10^{-4} auf 1.96×10^{-2} zeigte die schrittweise Selektion und Anreicherung von Phagen, die mit Hilfe der präsentierten Nanobodies an Faktor H binden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die ausplattierten Einzelkolonien mittels eines PE-ELISA untersucht (3.2.2.3).

3.2.2.2. Untersuchung der Reinheit von der Faktor H-Lösung mittels SDS-PAGE

Da Faktor H zum einen zur Immunisierung des Alpaka/Lama-Hybrids (2.2.4.1) und zum anderen als Antigen während des Phagen-Displays (2.2.5) verwendet wurde, war die Reinheit des Proteins zur Herstellung spezifischer Nanobodies entscheidend. Verunreinigende Substanzen erhöhen die

Wahrscheinlichkeit, dass Nanobodies selektiert werden, die an andere Proteine als das gewünschte Antigen binden (Carmen und Jermutus, 2002). Daher wurden 10 µg des Proteins mittels SDS-PAGE (2.2.2.1) und anschließender Coomassie-Färbung auf mögliche Verunreinigungen untersucht. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

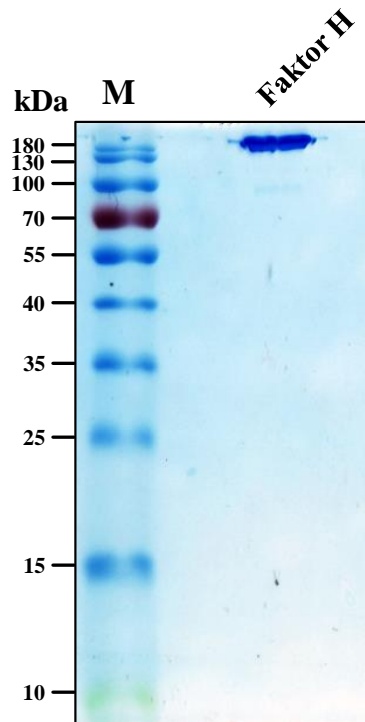


Abbildung 3.20 SDS-Polyacrylamidgel zur Reinheitsbestimmung der Faktor H-Lösung. Zur Bestimmung der Reinheit wurden 10 µl der Faktor H-Lösung (1.04 mg/ml) mit Hilfe eines 13% (w/v) SDS-Polyacrylamidgels unter nicht reduzierenden Bedingungen untersucht. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies).

Durch die Auftrennung der Proteine von der Faktor H-Lösung wurde gezeigt, dass keine sichtbaren proteinogenen Verunreinigungen vorlagen. Des Weiteren wurde Faktor H aufgrund der erwarteten molaren Masse von 155 kDa (Vik *et al.*, 1990) nachgewiesen. Auf Grund des hohen Reinheitsgrades konnte davon ausgegangen werden, dass die Faktor H-Lösung zur Immunisierung und anschließender Identifikation von Anti-Faktor H-Nanobodies geeignet war.

3.2.2.3. Screening von Nanobodies gegen Faktor H mittels PE-ELISA

Zur Identifizierung von Nanobodies, die spezifisch an Faktor H binden, wurde zunächst ein PE-ELISA (2.2.5.3) durchgeführt. Dazu wurden aus der zweiten und dritten Panningrunde insgesamt 67 Einzelkolonien untersucht. Die VHH-pIII-Fusionsproteine wurden durch IPTG-Induktion mit Hilfe von Übernachtskulturen produziert. Am nächsten Tag wurde der periplasmatische Extrakt mit den Fusionsproteinen in einem ELISA analysiert. Falls der Quotient der Absorptionswerte von zwei Kavitäten, die entweder mit Faktor H oder PBS beschichtet wurden, nach dem Farbumschlag über zwei lag, wurde die cDNA des dazugehörigen Nanobodies sequenziert (Ghassabeh *et al.*, 2010). In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des PE-ELISAs nach der zweiten Panningrunde aufgeführt. Dabei wurden die Quotienten der Absorptionswerte von 23 Einzelkolonien verglichen.

Tabelle 3.8 Übersicht über Quotienten der Absorptionswerte nach der zweiten Panningrunde. Nach der zweiten Panningrunde wurden 23 Einzelkolonien untersucht. Die Quotienten der Absorptionswerte sind nach ihrer Größe sortiert. Bei der „PBS“-Kontrolle wurde anstelle der Bakterienkultur TB-Amp-Medium verwendet. Anschließend wurden zwei Kavitäten, von denen eine mit Faktor H und die andere mit PBS beschichtet war, mit je 100 µl PBS anstelle des periplasmatischen Extrakts befüllt. Die isolierten pHEN4-Vektoren der markierten Kolonien wurden zum Sequenzieren geschickt. Die Messungen wurden bei 405 nm nach 15 Minuten durchgeführt.

Kolonie	Ratio	Kolonie	Ratio
17	20.42	3	9.40
20	18.38	11	7.23
19	18.02	2	4.80
5	17.88	10	4.03
23	17.78	6	4.00
13	17.65	18	3.50
14	17.49	21	1.45
4	16.29	16	1.45
7	16.15	1	1.30
8	15.34	22	1.11
12	14.84	9	1.08
15	11.81	PBS	1.00

Von den 23 untersuchten Kolonien wurden nach der Durchführung des PE-ELISAs 18 mit einem Quotienten der Absorptionswerte von über zwei bestimmt. Zur weiteren Untersuchung wurden alle

Kolonien mit einer Ratio von über 10 verwendet, welche in Tabelle 3.8 entsprechend markiert sind. Als zusätzliche Kontrolle wurde ebenfalls mit der Einzelkolonie 10 weitergearbeitet, da sie im Gegensatz zu den anderen Kolonien eine Ratio von unter 10 aufwies. Anschließend wurde bei den ausgewählten Einzelkolonien mittels Colony Screening eine VHH-cDNA mit der Größe von ungefähr 650 bp nachgewiesen. Daraufhin wurde mit Hilfe von DNA-Präparationen der Übernachtskulturen die cDNA der VHHs sequenziert und analysiert (vgl. 7.2).

Nach der dritten Panningrunde wurden 44 Einzelkolonien untersucht. In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse des PE-ELISAs aufgeführt.

Tabelle 3.9 Übersicht über die Quotienten der Absorptionswerte nach der dritten Panningrunde. Nach der dritten Panningrunde wurden 44 Einzelkolonien untersucht. Die Quotienten der Absorptionswerte sind nach ihrer Größe sortiert. Bei der „PBS“-Kontrolle wurde anstelle der Bakterienkultur TB-Amp-Medium verwendet. Später wurden zu den zwei Kavitäten, welche entweder mit Faktor H oder mit PBS beschichtet wurden, je 100 µl PBS anstelle des periplasmatischen Extrakts gegeben. Die isolierten pHEN4-Vektoren der markierten Kolonien wurden zum Sequenzieren geschickt. Die Messungen wurden bei 405 nm nach 15 Minuten durchgeführt.

Kolonie	Ratio	Kolonie	Ratio	Kolonie	Ratio	Kolonie	Ratio
4	8.64	33	2.16	30	1.02	5	0.98
27	6.50	34	2.09	14	1.01	26	0.98
16	6.32	22	1.93	41	1.01	PBS	0.98
1	4.78	37	1.87	13	1.00	7	0.97
3	3.97	21	1.33	28	1.00	8	0.97
15	3.96	32	1.16	29	1.00	10	0.97
35	3.82	12	1.08	17	1.00	18	0.96
42	3.50	31	1.07	11	0.99	9	0.93
40	3.35	39	1.04	38	0.99	19	0.90
20	3.23	24	1.03	6	0.99	25	0.88
36	3.20	pHEN4	1.03	23	0.99		
43	3.01	44	1.02	2	0.98		

Nach der Durchführung des PE-ELISAs mit 44 Einzelkolonien aus der dritten Panningrunde wurden 14 Kolonien identifiziert, die einen Quotienten der Absorptionswerte von über zwei aufwiesen. In Tabelle 3.9 sind die Kolonien markiert, die für ein Colony Screening zum Nachweis der VHH-cDNA verwendet wurden. Bei den Kolonien 3 und 43 konnte kein entsprechendes Amplifikat nachgewiesen

werden, so dass zur Bestimmung der Nanobody-Sequenzen (vgl. 7.2) nur die DNA-Präparationen von Übernachtskulturen der übrigen Kolonien verwendet wurden.

Anhand der Auswertung der „PBS“-Kontrolle konnte gezeigt werden, dass weder der primäre Anti-HA-Antikörper noch der sekundäre Anti-Kaninchen IgG-AP-Antikörper spezifisch an Faktor H oder an Bestandteile der Blockierungslösungen gebunden hatte. Die pHEN4-Kontrolle zeigte, dass auch keine anderen Genprodukte der transformierten TG1-Zellen mit den beiden eingesetzten Antikörpern interagierten. Damit erwies sich das Nachweisverfahren als spezifisch für Nanobodies, die an den immobilisierten Faktor H gebunden hatten.

Aufgrund der cDNA-Sequenzen, die durch die Sequenzierung der 25 VHH-Sequenzen ermittelt worden waren, konnte ein Vergleich auf Aminosäureebene durchgeführt werden (vgl. 7.2). Nach dem Alignment wurden die ermittelten Nanobody-Sequenzen sechs unterschiedlichen Familien zugeordnet. Dabei konnten die nach der zweiten Panningrunde ermittelten VHH-Sequenzen auch nach der dritten Runde identifiziert werden (vgl. 7.2). Eine Ausnahme stellte lediglich die Sequenz von Nb-2-17 dar, die nur nach der zweiten Runde detektierbar war. Das war ein Hinweis dafür, dass eine spezifische Selektion für Einzeldomänenantikörper mit einer Affinität zu Faktor H stattgefunden hatte. Die Kolonie 10 aus der zweiten Panningrunde wurde als Kontrolle zum Vergleich mit den anderen Aminosäuresequenzen ausgewählt. Die gleiche cDNA-Sequenz konnte bei den Kolonien 1, 16 und 27 nach der dritten Panningrunde nachgewiesen werden. Diese drei Kolonien erreichten hohe Werte (vgl. Tabelle 3.9) in der anschließenden Auswertung des PE-ELISAs. Das lässt darauf schließen, dass sich die absoluten Werte der beiden PE-ELISAs nicht aussagekräftig vergleichen lassen. Auf die Durchführung einer vierten Panningrunde wurde verzichtet, da nach der dritten Runde nur eine neue VHH-Sequenz (NbFH-3-36) festgestellt wurde. Damit war es unwahrscheinlich, noch weitere cDNA-Sequenzen von möglichen Nanobodies mit einer Affinität zu Faktor H zu identifizieren (Kumaran *et al.*, 2012). Die Ergebnisse der Klassifizierung sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Bei den Alignments der Aminosäuresequenzen wurden Lücken in der CDR3-Sequenz nach Chothia und Lesk (1987) eingeführt.

	<-----FR1----->	<-CDR1->	<-----FR2----->	<-CDR2->
NbFH-2-17	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS C VAS	GRTFDDYN	MGWFRQAPGK ERE FVAG	ISWNGAAK
NbFH-2-20	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLS C AAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGK GREL VAT	ITSTGDRT
NbFH-2-5	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS C VAS	GRTFGDYN	MGWFRQAPGK ERE FVVG	ISWNGAHK
NbFH-2-10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS C AAS	GLAFSLYT	MAWYRQAPGN QREL VAR	ISSISTT
NbFH-2-15	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLS C VAS	GGTFSGYT	VGWFRQAPGK ERE FVTF	ITGNSELT
NbFH-3-36	QVQLQESGGGLVQLGGSLRLS C AAS	GSILSISV	MAWYRQVSGN QRKL VAR	ITDGGNT

	<-----FR3----->	<-----CDR3----->	<---FR4--->
NbFH-2-17	YYVDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPEDTAVYY C	AAEKGTLNYS LVDRPGTYGY	YGQGTQVTVSS
NbFH-2-20	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYY C	YTKASWG -----AGY	WGQGTQVTVSS
NbFH-2-5	YYVDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPEDTAVYY C	AAEKGTLNYNLADR PGTYGY	YGQGTQVTVSS
NbFH-2-10	TYTDSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNDLKPEDTAVYY C	NGLAPNYLSA -----RQY	WGQGTQVTVSS
NbFH-2-15	SYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYY C	AAYSRRSTWPTQV --GDYTY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-36	DYSDSVRGRFTISRDNALNTVYLQMNSLAPEDTAVYY C	YAQQRSS -----RGY	WGQGTQVTVSS

Abbildung 3.21 Klassifizierung der Nanobody-Sequenzen. Ausgehend von den Sequenzalignments der 25 VHH-Sequenzen (vgl. 7.2) wurden sechs Nanobody-Familien klassifiziert. In dieser Abbildung ist die Aminosäuresequenz jeder Familie aufgelistet. Im Folgenden wird die Nomenklatur der Nanobodies erläutert. NbFH-X-Y: Das X steht für die Panningrunde, in der die VHH-Sequenz das erste Mal identifiziert wurde, und das Y bezeichnet die untersuchte Einzelkolonie. FR: *Framework region*. CDR: *Complementarity determining region*. Die rosa markierten Cysteine C22 und C94 bzw. C95 bilden untereinander eine Disulfidbrücke aus. Die unterstrichenen Aminosäuren sind charakteristisch für VHH-Sequenzen. Die Darstellung erfolgte nach Kabat *et al.* (1991).

Das dargestellte Alignment in Abbildung 3.21 zeigt die für VHH-Domänen typischen Aminosäuresubstitutionen. Da Schwerekettenantikörper keine VL-Sequenzen aufweisen, die über hydrophobe Wechselwirkungen mit den VH-Sequenzen interagieren, wurden zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit vier Aminosäuren in der FR2-Sequenz ersetzt (Harmsen *et al.*, 2000). So treten bei Tieren der Art *Lama glama* die Aminosäuresubstitutionen V37F/Y, G44E/Q, L45R und W47F/L auf. Bei NbFH-2-20 konnte keine Substitution von Glycin an der Position 44 nachgewiesen werden. Dieses Ereignis wurde in 11% der Fälle bei untersuchten Nanobody-Sequenzen in einer Analyse von Harmsen *et al.* (2000) nachgewiesen. Damit wurde gezeigt, dass die sechs identifizierten Nanobodies die für Einzeldomänenantikörper typischen Aminosäuresequenzen aufwiesen. Somit erfolgte keine Kontamination durch VH-cDNA während der Klonierung der Phagen-Bibliothek (2.2.4.3).

Die beiden hochkonservierten Cysteine an den Positionen C22 und C94 bzw. C95 bilden miteinander eine Disulfidbrücke aus und verbinden somit die FR1- mit der FR2-Sequenz (Muyldermans *et al.*, 1994). Die bei Nanobodies häufig vorkommenden Cysteine in den CDR1- und CDR3-Sequenzen, die ebenfalls Disulfidbrücken miteinander ausbilden (Harmsen *et al.*, 2000) und zur Stabilität beitragen (Davies und Riechmann, 1996), konnten hingegen nicht festgestellt werden.

Die durchschnittliche Länge der sechs CDR3-Sequenzen (vgl. Abbildung 3.21) von 15.2 Aminosäuren bestätigt damit die Annahme, dass HCABs auf Grund des Verlustes der VL-Domäne ihre kleinere Oberfläche zum Binden von Antigenen mit Hilfe von größeren CDR3-Domänen kompensieren

(Conrath *et al.*, 2003). Die durchschnittliche Länge der CDR3-Sequenzen von Lamas beträgt 15 Aminosäuren (Vu *et al.*, 1997) und ist damit deutlich länger als die entsprechenden CDR3-Sequenzen der schweren Ketten konventioneller IgG-Antikörpern bei Menschen (13 AS) und Mäusen (10 AS) (Wu *et al.*, 1993). Eine lange CDR3-Sequenz ist jedoch nicht obligatorisch für Schwerekettenantikörper, da HCABs auch kurze Ketten von bis zu sieben Aminosäuren aufweisen können (Conrath *et al.*, 2003).

Auffällig ist die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von NbFH-2-17 und NbFH-2-5, welche sich jeweils nur in einer Aminosäure in der CDR1- und CDR2-Sequenz und in zwei Aminosäuren in der CDR3-Sequenz unterscheiden. Das lässt darauf schließen, dass die beiden Sequenzen ihren Ursprung in derselben B-Zelllinie haben (Harmsen *et al.*, 2000) und die Aminosäurevariationen durch die hohe Rate an somatischen Hypermutationen bei VHHs entstanden sind (Nguyen *et al.*, 2000). Durch die geringen Sequenzunterschiede kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Nanobodies wahrscheinlich an dasselbe Epitop binden.

Die beiden PE-ELISAs unterschieden sich deutlich in der Größe der Quotienten der Absorptionswerte. Obwohl z.B. die Nanobodies NbFH-2-5 und NbFH-3-4 die gleichen Aminosäuresequenzen aufweisen (vgl. 7.2), wurde in den beiden Untersuchungen jeweils ein Quotient von 17.88 und 8.64 festgestellt. Die Differenz erklärt sich damit, dass die Zelldichte der TG1-Zellen nicht durch eine optische Messung überprüft wurde. Somit wurde die Anzahl der Bakterien nicht normalisiert. Falls mehr Zellen über einen längeren Zeitraum VHH-pIII-Fusionsproteine produzieren, werden auch höhere Absorptionswerte gemessen. Alternativ hätte auch ein Phagen-ELISA durchgeführt werden können, bei dem anstatt der Fusionsproteine die entsprechenden assemblierten Phagen in die Kavitäten gegeben werden. Durch eine optische Bestimmung der Phagenkonzentration können so gleich viele Phagen in jede Vertiefung überführt werden. Des Weiteren zeichnet sich diese Technik noch durch eine höhere Sensitivität aus. Denn zur Detektion werden Antikörper verwendet, die an das Protein pIII binden, welches in vielen Kopien bei M13-Phagen vorliegt (vgl. Abbildung 2.3) (Wu *et al.*, 2011). Auf Grund der vielen untersuchten Kolonien wurde auch darauf verzichtet, bei der Messung mit Triplikaten zu arbeiten. Um die Ergebnisse der beiden PE-ELISAs besser miteinander vergleichen zu können, wurde ein weiterer PE-ELISA durchgeführt. Dabei wurden je drei Einzelkolonien untersucht, welche jeweils einen der sechs Nanobodies produzierten. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.22 aufgeführt.

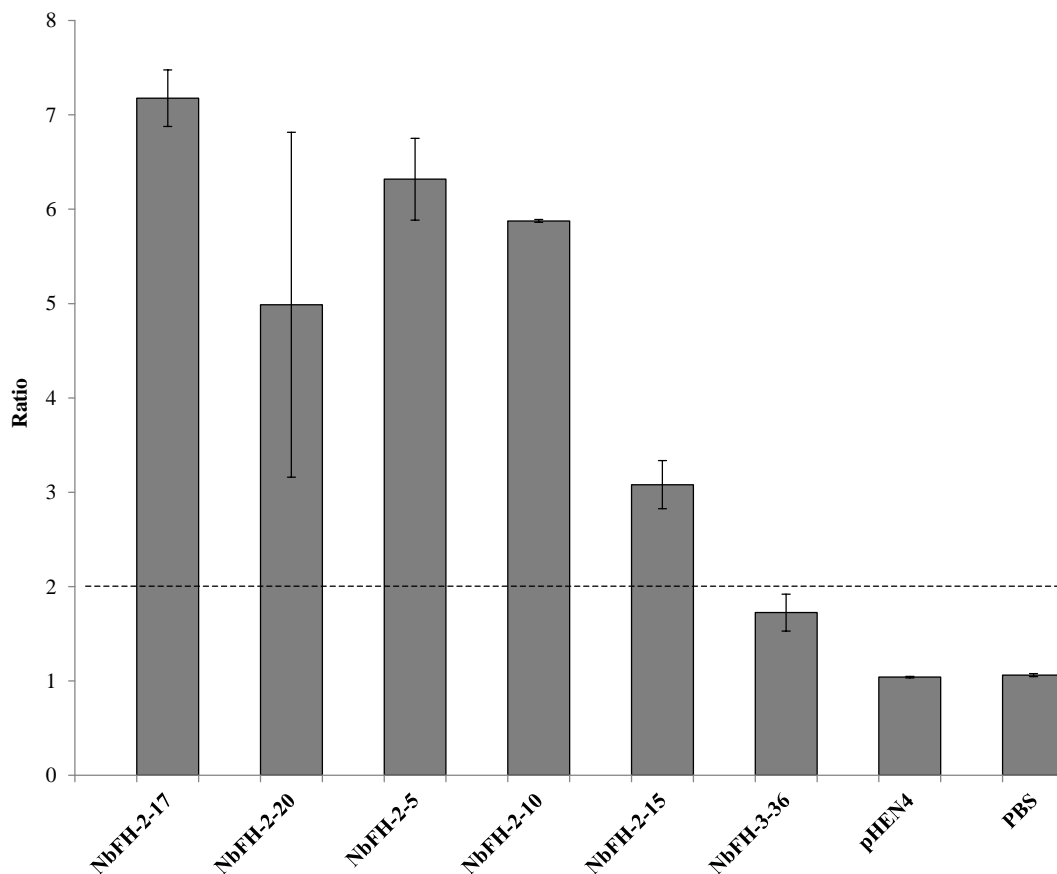


Abbildung 3.22 Ergebnisse des PE-ELISAs der sechs unterschiedlichen Nanobodies. Um den periplasmatischen Extrakt der sechs unterschiedlichen Nanobodies zu vergleichen, wurde ein PE-ELISA durchgeführt. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert, bei dem die untersuchten Kolonien als positiv eingestuft wurden. Bei der „pHEN4“-Kontrolle wurden TG1-Zellen eingesetzt, die mit einem pHEN4-Vektor ohne Insert transformiert wurden. Des Weiteren wurde bei der „PBS“-Kontrolle nur TB-Amp-Medium verwendet. Später wurden in drei Kavitäten, welche entweder mit Faktor H oder mit PBS beschichtet wurden, je 100 µl PBS anstelle des periplasmatischen Extrakts gegeben. Im Balkendiagramm sind die berechneten Verhältnisse und deren Standardabweichungen dargestellt. Die Messung der Triplikate wurde bei 405 nm nach 15 Minuten durchgeführt.

Anhand der Auswertung des PE-ELISAs wurde gezeigt, dass der Nanobody NbFH-3-36 unter dem Schwellenwert von zwei lag. Trotzdem wurde mit ihm als Kontrolle weitergearbeitet. Von den anderen Nanobodies wurden die höchsten Werte bei NbFH-2-17 und NbFH-2-5 festgestellt, die sich auch in ihrer Aminosäuresequenz stark ähnelten (vgl. Abbildung 3.21). Zusätzlich zeigten die Nanobodies NbFH-2-17 auch bei dem ersten und NbFH-2-5 (NbFH-3-4) bei dem zweiten PE-ELISA die höchsten Quotienten und waren damit vielversprechende Kandidaten zur Inhibierung des Entwicklungszyklus der Plasmodien. Wie in Tabelle 3.9 ersichtlich, wiesen die Einzeldomänenantikörper NbFH-3-27, NbFH-3-16 und NbFH-3-1 ebenfalls hohe Quotienten auf und bekräftigen das in Abbildung 3.22 dargestellte Ergebnis, da sie dieselben Sequenzen wie NbFH-2-10 besitzen. Als nächstes wurden die cDNA-Sequenzen der sechs unterschiedlichen Nanobodies in Expressionsvektoren kloniert (3.2.2.4).

Zur dauerhaften Lagerung der Bakterienkulturen mit den verschiedenen VHH-cDNA-Sequenzen wurden Glycerolstocks angelegt (2.2.1.17).

3.2.2.4. Klonierung der VHH-Sequenzen in den Expressionsvektor pHEN6(c)

Zur Produktion der sechs Nanobodies wurden die unterschiedlichen VHH-Sequenzen jeweils zwischen eine *pelB*-Leader-Sequenz und einem Hexahistidin-Tag in den Expressionsvektor pHEN6(c) kloniert. Die schematische Darstellung des Konstrukts ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

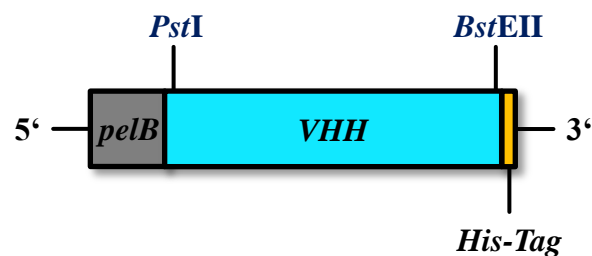


Abbildung 3.23 Schematische Darstellung des VHH-Konstrukts zur Produktion von Nanobodies. Mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *PstI* und *BstEII* wurden die VHH-Sequenzen in den Expressionsvektor pHEN6(c) kloniert. Am 5'-Ende befand sich eine *pelB*-Leader-Sequenz zum Transport des Nanobodies in den periplasmatischen Raum, die anschließend durch eine Signalpeptidase abgespalten wurde (Choi und Lee, 2004). Am 3'-Ende lag eine Sequenz für ein His-Tag zur späteren Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie vor.

Zunächst wurden der pHEN6(c)-Vektor und das jeweilige pHEN4-Plasmid, welche die inserierte VHH-Sequenz besaß, mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *PstI* und *BstEII* geschnitten. Der Expressionsvektor pHEN6(c) wurde zusätzlich noch mit einer thermosensitiven, alkalischen Phosphatase behandelt (2.2.1.4). Anschließend wurden die Restriktionsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt und der linearisierte pHEN6(c)-Vektor bei ungefähr 3270 bp und die VHH-Sequenzen bei ungefähr 350 bp aus der Gelmatrix eluiert (2.2.1.2). Als nächstes wurden beide Fragmente über Nacht ligiert. Daraufhin wurde der Ligationsansatz zur Transformation verwendet. In der cDNA-Sequenz des Nanobodies NbFH-3-36 befand sich eine zusätzliche *PstI*-Schnittstelle, so dass nach dem Restriktionsverdau zwei Fragmente von 228 bp und 95 bp Länge aus dem Gel extrahiert wurden. Nach Ligation der beiden cDNA-Fragmente in den pHEN6(c)-Vektor erfolgte eine Transformation von *E. coli*-Bakterien des Stammes TOP10. Nach einem Colony Screening und einer DNA-Präparation wurde das Plasmid ebenfalls zur Transformation verwendet. Nun wurden kompetente WK6-Zellen mit den Konstrukten durch Elektroporation transformiert (2.2.1.8) und auf LB-Amp-Glu-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurde ein Colony Screening mit den Primern RP und FP durchgeführt (2.2.1.11). Die Kolonien, welche eine Amplifikatgröße von ungefähr 550 bp aufwiesen,

wurden daraufhin über Nacht in 4 ml LB-Amp-Glu-Medium bei 37°C und 200 UpM kultiviert. Als nächstes wurde eine DNA-Präparation (2.2.1.12) durchgeführt und die inserierten VHH-Sequenzen wurden mit Hilfe der Primer RP und FP sequenziert (2.2.1.18). Dabei wurde festgestellt, dass alle sechs Konstrukte erfolgreich hergestellt und zur Produktion der Nanobodies verwendet werden konnten. Zur Archivierung der Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angelegt (2.2.1.17). Mit Hilfe des Programms „Vector NTI Advance® 11.5.2“ (Life Technologies) wurden anhand der bekannten Nukleotidsequenzen die in Tabelle 3.10 aufgeführten Eigenschaften bestimmt.

Tabelle 3.10 Eigenschaften der sechs unterschiedlichen Nanobodies. Bei der Nomenklatur der Nanobodies wurde folgendes System angewandt: Bei dem Schema NbFH-X-Y-Z steht das X für die Panningrunde, nach der die VHH-Sequenz das erste Mal identifiziert wurde, das Y entspricht der untersuchten TG1-Einzelkolonie und das Z der WK6-Einzelkolonie, welche mit dem pHEN6(c)-Vektor und der jeweiligen VHH-Sequenz transformiert wurde. Bei dem NbFH-3-36-5-1 steht die „5“ für die untersuchte TOP10- und die „1“ für die überprüfte WK6-Einzelkolonie. Die Längen sind inklusive des Hexahistidin-Tags angegeben. Anhand der molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten wurden die Berechnungen der Nanobodykonzentrationen nach einer photometrischen Messung durchgeführt (2.2.2.8). AS: Aminosäure.

Nanobody	Länge [AS]	molare Masse [Da]	Extinktionskoeffizient [l×mol ⁻¹ ×cm ⁻¹]
NbFH-2-17-1	133	14686	24420
NbFH-2-20-2	123	13539	27550
NbFH-2-5-1	133	14721	24420
NbFH-2-10-1	125	13770	20580
NbFH-2-15-4	131	14381	26270
NbFH-3-36-5-1	122	13402	20580

3.2.2.5. Produktion und Aufreinigung der Anti-Faktor H-Nanobodies

Zur Charakterisierung und Untersuchung der inhibitorischen Effekte auf die Entwicklung von Plasmodien im Darmtrakt der *Anopheles*-Mücken (2.2.6.3) wurden die sechs unterschiedlichen Anti-Faktor H-Nanobodies (3.2.2.3) zuerst in ausreichender Menge und mit einem möglichst hohen Reinheitsgrad produziert. Im Folgenden ist exemplarisch die Herstellung des Nanobodies NbFH-2-17-1 gezeigt. Die Produktion des Einzeldomänenantikörpers wurde mit einer Kontrolle bestehend aus WK6-Zellen, welche mit einem pHEN6(c)-Vektor ohne Insert transformiert wurden, verglichen. Dabei wurden Bakterien vor der Zugabe von IPTG als auch nach der Kultivierung über Nacht untersucht. Des Weiteren wurden sowohl die Pellets nach dem Zellaufschluss als auch der zugehörige Überstand analysiert (2.2.2.5). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 aufgeführt.

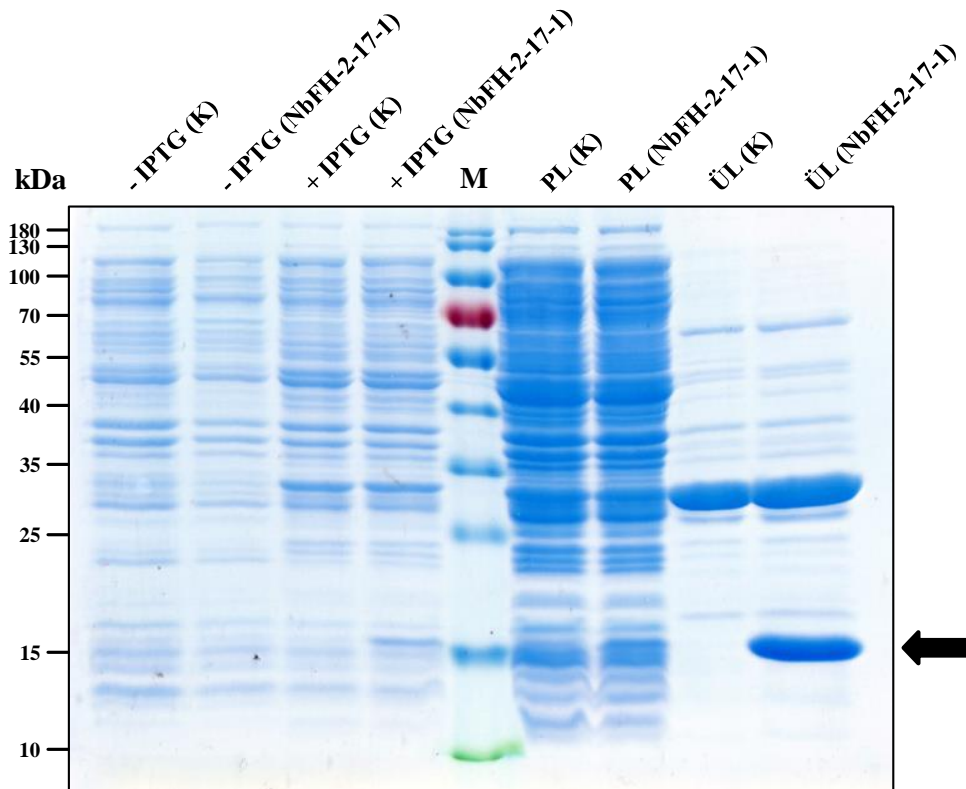


Abbildung 3.24 SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Produktion von NbFH-2-17-1. Zur Analyse der Produktion des Nanobodies NbFH-2-17-1 wurden 25 µl jeder Probe mit einem 13% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. Der Pfeil zeigt die Bande mit dem Nanobody NbFH-2-17-1 (14.7 kDa). M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies). -IPTG: Bakterienzellen vor der Zugabe von IPTG. +IPTG: Bakterienzellen nach der Zugabe von IPTG und Kultivierung über Nacht. PL: Pellet Lysat. ÜL: Überstand Lysat. (K): Kontrolle mit WK6-Zellen, die mit dem pHEN6(c)-Vektor ohne Insert transformiert wurden.

Wie in Abbildung 3.24 zu sehen ist, wurde der Nanobody NbFH-2-17-1 durch die Bakterien erfolgreich produziert. Nach der IPTG-Induktion und der Kultivierung von WK6-Zellen über Nacht ist eine Überexpression des *NbFH-2-17*-Gens im Vergleich zur Kontrolle bei ca. 15 kDa zu erkennen. Nach der anschließenden Zelllyse befanden sich die VHHs zum überwiegenden Teil im Überstand und waren als deutliche Bande sichtbar. Damit wurde nachgewiesen, dass die produzierten Nanobodies nicht als unlösliche Proteinaggregate vorlagen (Garcia-Fruitos, 2010). Dieses Ergebnis zeigte eine vielversprechende Ausgangssituation zur Aufreinigung (2.2.2.6). Des Weiteren führte die Zugabe von IPTG auch zur Produktion eines unbekannten Proteins von ca. 30 kDa, da entsprechende Banden in beiden Bakterienkulturen nach Inkubation über Nacht und dem Zellaufschluss detektiert werden konnten. Die Überexpression des unbekannten Gens wurde auch in einer anderen Publikation gezeigt und scheint generell bei WK6-Zellen nach IPTG-Induktion aufzutreten (Ghahroudi *et al.*, 1997).

Als nächstes wurden die im Überstand enthaltenen Nanobodies mittels Affinitätschromatographie (2.2.2.6) aufgereinigt. Zur Elution der Einzeldomänenantikörper wurde dreimal nacheinander eine Elutionslösung (250 mM Imidazol) durch ein Protino® Ni-TED Resin (Macherey-Nagel) laufen gelassen. Die Ergebnisse der Aufreinigung sind in Abbildung 3.25 dargestellt.

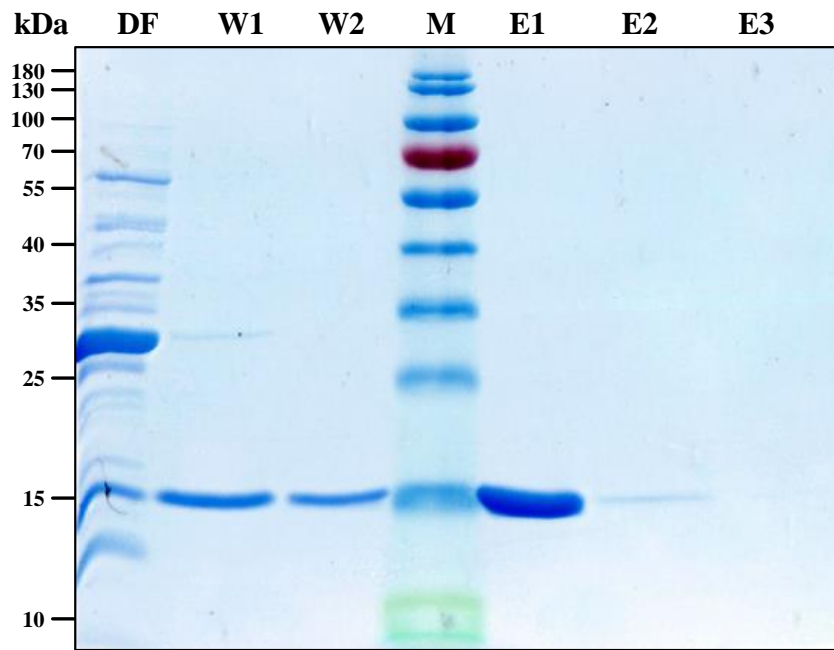


Abbildung 3.25 SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Aufreinigung von NbFH-2-17-1. Zur Analyse der Aufreinigung des Nanobodies NbFH-2-17-1 mittels Affinitätschromatographie wurden 25 µl jeder Probe mit einem 13% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies). DF: Durchfluss. W1: Waschfraktion 1. W2: Waschfraktion 2. E1: Elutionsfraktion 1. E2: Elutionsfraktion 2. E3: Elutionsfraktion 3.

Die durch eine Überexpression eines unbekannten Gens entstandene Bande (vgl. Abbildung 3.24) bei ca. 30 kDa wurde während der Aufreinigung im Durchfluss detektiert und besitzt somit keine Affinität zu den Ni^{2+} -Kationen im Granulat. Sowohl im Durchfluss des Lysat-Überstandes als auch in den beiden Waschlösungen wurden jeweils Nanobodies nachgewiesen. Anhand der Überprüfung durch eine SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass die Nanobodies hauptsächlich nach dem ersten Elutionsschritt von dem Imidazol verdrängt wurden. Aus diesem Grund wurde nur mit der Elutionsfraktion 1 weitergearbeitet.

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden die VHHs mit Hilfe der „Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 10K Devices“ (Merck-Millipore) in PBS überführt und konzentriert (2.2.2.7). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

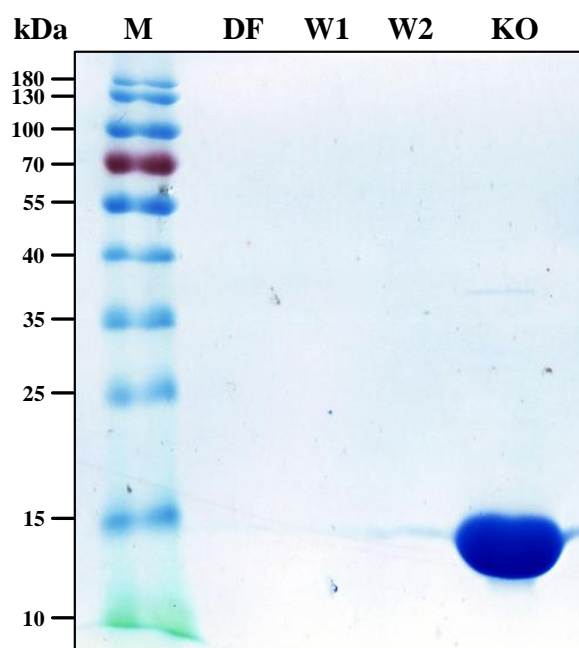


Abbildung 3.26 SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Umpufferung und Konzentrierung von NbFH-2-17-1. Zur Analyse der Umpufferung und Konzentrierung des Nanobodies NbFH-2-17-1 wurden 25 µl jeder Probe mit einem 13% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies). DF: Durchfluss der Elutionsfraktion. W1: Waschschrift 1 mit PBS. W2: Waschschrift 2 mit PBS. KO: Konzentrat NbFH-2-17-1.

Das SDS-Polyacrylamidgel zeigte, dass die Überführung der Nanobodies in PBS und die darauffolgende Konzentrierung erfolgreich war. Die Produktion der übrigen Einzeldomänenantikörper der unterschiedlichen Familien wurde äquivalent zu der Herstellung des Nanobodies NbFH-2-17-1 durchgeführt. Die Ausbeuten sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3.11 Konzentrationen der produzierten und aufgereinigten Nanobodies. Die Konzentrationen der sechs unterschiedlichen Nanobody-Lösungen wurden mit Hilfe von Bradford-Tests ermittelt. Bei der Ausbeute handelt es sich um die Gesamtmenge der produzierten Nanobodies. Konz.: Konzentration.

Nanobody	Konz. [mg/ml]	Ausbeute [mg]
NbFH-2-17-1	2.32	1.16
NbFH-2-20-2	12.63	6.32
NbFH-2-5-1	6.00	3.00
NbFH-2-10-1	2.93	1.47
NbFH-2-15-4	0.50	0.25
NbFH-3-36-5-1	0.15	0.08

Die Konzentrationen der produzierten Nanobody-Lösungen variierten von 0.15 mg/ml bis 12.63 mg/ml. Damit lagen die meisten Ausbeuten im erwarteten Bereich von mehreren Milligramm pro Liter Bakterienkultur (Muyldermans, 2013).

Nach der Herstellung der sechs unterschiedlichen Nanobodies wurde ein Vergleich mittels SDS-PAGE durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

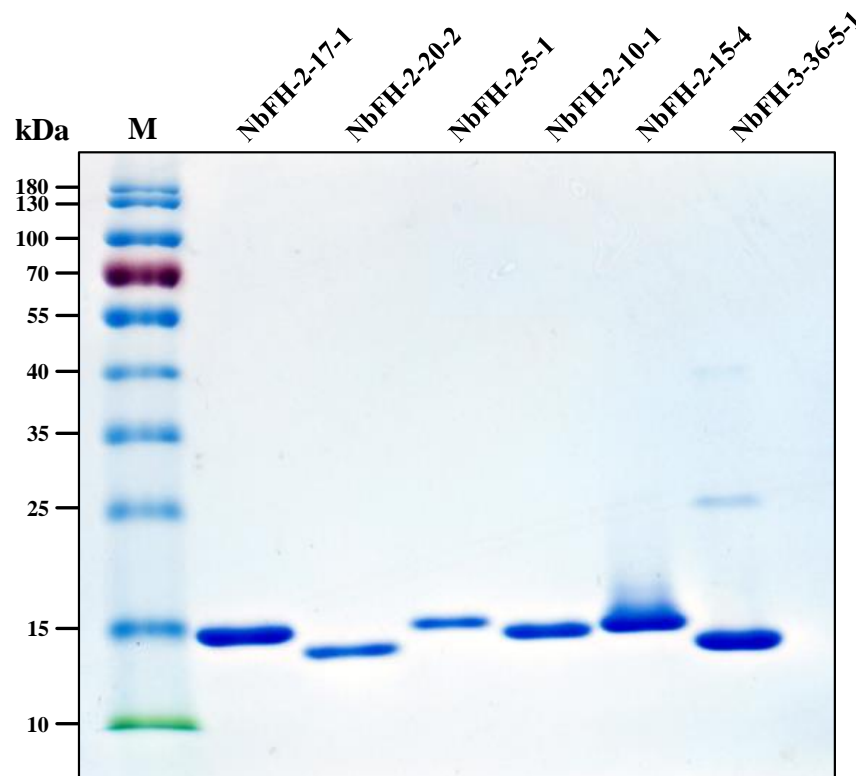


Abbildung 3.27 SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Produktion und Aufreinigung der sechs unterschiedlichen Nanobodies. Zur Analyse der hergestellten Nanobody-Lösungen wurden je 0.75 µg von jedem Einzeldomänenantikörper mit einem 13% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies).

Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigte einen hohen Reinheitsgrad der sechs unterschiedlichen Nanobody-Lösungen. Lediglich bei Nb-3-36-5-1 wurden leichte Verunreinigungen durch andere Proteine mit einer Größe von ca. 25 und 40 kDa detektiert. Als nächstes wurde die Affinität der Nanobodies zum Antigen Faktor H mittels ELISA überprüft.

3.2.2.6. Untersuchung der Bindungsaffinität der Nanobodies zu Faktor H mittels ELISA

Zur Charakterisierung der Bindungsaffinitäten der sechs unterschiedlichen Nanobodies zu Faktor H wurde ein ELISA (2.2.2.4) durchgeführt. Dazu wurden drei Kavitäten einer ELISA-Platte mit einer Faktor H-Lösung und zum Vergleich drei Kavitäten mit PBS beschichtet. In jede dieser Kavitäten wurden 100 µl der jeweiligen Nanobody-Lösung mit einer Konzentration von 150 µg/ml gegeben. Die Bindung der Nanobodies an das Antigen wurde mit einem sekundären Antikörper überprüft, der eine Affinität zum His-Tag der rekombinanten Einzeldomänenantikörper hatte und zur Detektion mit einer Meerrettichperoxidase fusioniert war. Die Ergebnisse des ELISAs sind in Abbildung 3.28 aufgeführt.

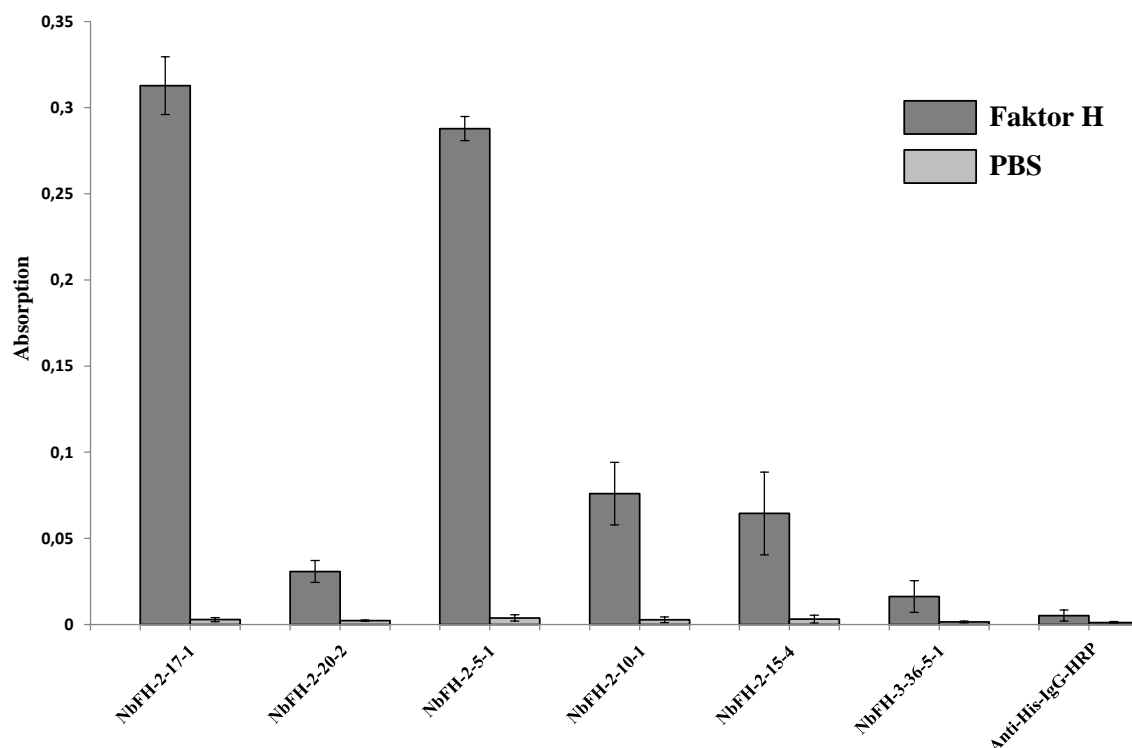


Abbildung 3.28 Ergebnisse des ELISAs zum Vergleich der Bindungsaffinitäten der sechs unterschiedlichen Nanobodies zu Faktor H. Für jeden untersuchten Nanobody und für die Kontrolle Anti-His-IgG-HRP sind zwei Balken dargestellt. Der dunkelgraue Balken zeigt die Absorption des Farbstoffes in Kavitäten, die mit Faktor H beschichtet wurden. Der hellgraue Balken zeigt die Absorption in Kavitäten, welche zuvor mit PBS inkubiert wurden. Im Balkendiagramm sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen von den Messungen der Triplikate dargestellt. Von den Mittelwerten der Messdaten sind bereits die Mittelwerte der PBS-Kontrolle abgezogen. Bei der Kontrolle Anti-His-IgG-HRP wurde statt der Nanobody-Lösung PBS verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte nach 17 Minuten bei 450 nm.

Ausgehend von den Ergebnissen des ELISAs hatten die Nanobodies NbFH-2-17-1 und NbFH-2-5-1 eine deutlich höhere Affinität zu Faktor H als die übrigen VHHs. Der Grund für die ähnlich hohen

Absorptionswerte sind wahrscheinlich die zum großen Teil übereinstimmenden Aminosäureabfolgen der CDR-Sequenzen (3.2.2.3). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Nanobodies spezifisch an Faktor H binden. Die Absorptionswerte der Kavitäten, die mit PBS beschichtet wurden (hellgraue Balken), sind im Vergleich zu den mit Faktor H beschichteten Kavitäten (dunkelgraue Balken) viel geringer. Somit kann eine unspezifische Bindung der Einzeldomänenantikörper gegen Magermilchproteine ausgeschlossen werden. Die Überprüfung des Bindungsverhaltens des eingesetzten sekundären Antikörpers zeigte, dass keine Affinität zu Faktor H oder den Magermilchproteinen vorlag. Durch den Vergleich des oberen Balkendiagramms mit den Ergebnissen des PE-ELISAs (vgl. Abbildung 3.22) wurde die Einordnung in unterschiedlich starke Binder an Faktor H ermöglicht. In absteigender Reihenfolge haben damit am besten NbFH-2-17-1, NbFH-2-5-1, NbFH-2-10-1, NbFH-2-15-4, NbFH-2-20-2 und NbFH-3-36-5-1 an das Antigen gebunden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse schienen die beiden Nanobodies NbFH-2-17-1 und NbFH-2-5-1 die potenziell besten Kandidaten zur Inhibierung des Lebenszyklus der Plasmodien im Darm der Mücke zu sein. Alle sechs Einzeldomänenantikörper wurden daraufhin in einem *in vivo* Experiment (2.2.6.3) untersucht.

3.2.3. Charakterisierung von NbFH-2-17-1 mittels Bio-Layer-Interferometrie

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten des Nanobodys NbFH-2-17-1 wurde mit Hilfe der Bio-Layer-Interferometrie durch Verwendung des Octet RED Systems (FortéBio) durchgeführt. Dieser Nanobody hatte sowohl im PE-ELISA (vgl. Abbildung 3.22) als auch im ELISA mit den aufgereinigten Einzeldomänenantikörpern (vgl. Abbildung 3.28) die höchste Affinität zu Faktor H und wurde deswegen exemplarisch charakterisiert. Der Nanobody NbFH-2-17-1 weist primäre Amine in den CDR2- und CDR3-Sequenzen (vgl. Abbildung 3.21) auf, so dass von einer Biotinylierung zur Beladung von Streptavidin-Biosensoren abgesehen wurde. Die chemische Modifizierung der Lysine in den CDR-Sequenzen könnte die Bindungsaffinität zum Antigen verändern. Aus diesem Grund wurden Ni-NTA-Biosensoren verwendet, um die Einzeldomänenantikörper auf Grund ihres C-terminalen His-Tags zu immobilisieren. Die Beladung der Biosensoren wurde mit einer Konzentration des Nanobodies von 10 µg/ml durchgeführt. Im Assoziationsschritt wurde Faktor H in sieben unterschiedlichen Konzentrationen (50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM, 3.13 nM, 1.56 nM) verwendet. Als Kontrolle wurde Interleukin-8 mit einer Konzentration von 50 nM eingesetzt und als Referenz diente ein optischer Biosensor, der während der Beladung in PBS gegeben und im Assoziationsschritt mit 50 nM Faktor H inkubiert wurde. In Abbildung 3.29 ist die Interaktion von NbFH-2-17-1 mit Faktor H grafisch dargestellt.

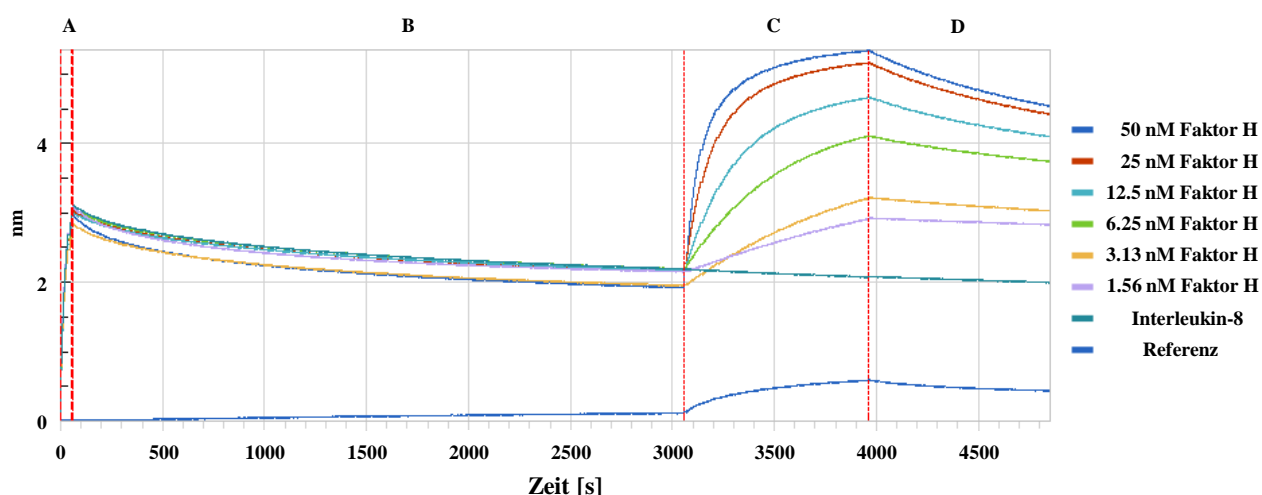


Abbildung 3.29 Darstellung der Interaktion von NbFH-2-17-1 mit Faktor H. Zur Darstellung der Interaktion von NbFH-2-17-1 mit Faktor H sind sechs verschiedene Konzentrationen von Faktor H verwendet worden. A: Beladung der optischen Biosensoren mit dem Nanobody NB-2-17-1. Der Sensor für die Referenzprobe wurde in eine Kavität mit PBS gegeben. B: Waschschrift. C: Assoziationsschritt mit dem Analyten Faktor H. Bei der Kontrolle wurde anstelle von Faktor H Interleukin-8 verwendet. D: Dissoziationsschritt.

Die erfolgreiche Beladung der Ni-NTA-Biosensoren war durch eine Veränderung des Interferenzmusters von ungefähr 3 nm während der ersten 60 Sekunden zu beobachten. Im Assoziationsschritt bestätigte eine Veränderung des Interferenzmusters von ungefähr 3 nm die Interaktion der gebundenen Nanobodies mit dem Analyten Faktor H. Bei der Kontrolle mit Interleukin-8 wurde keine Veränderung beobachtet. Damit wurde gezeigt, dass der Nanobody NbFH-2-17-1 spezifisch an das Antigen bindet und wahrscheinlich keine Affinität zu anderen Proteinen aufweist. Die Auswertung der prozessierten Daten von der Referenzprobe zeigte, dass Faktor H eine Affinität zu den Ni-NTA-Biosensoren besitzt. Diese Affinität ist jedoch deutlich geringer als die Interaktion der Einzeldomänenantikörper mit Faktor H. Die Affinität des Antigens an die optischen Biosensoren könnte minimiert werden, indem die Sensoren nach der Beladung mit einer Blockierungslösung inkubiert werden. Damit könnten während der Assoziation des Analyten die unspezifischen Wechselwirkungen reduziert werden. In der Abbildung 3.30 sind die Messdaten der Assoziations- und Dissoziationskurven gezeigt.

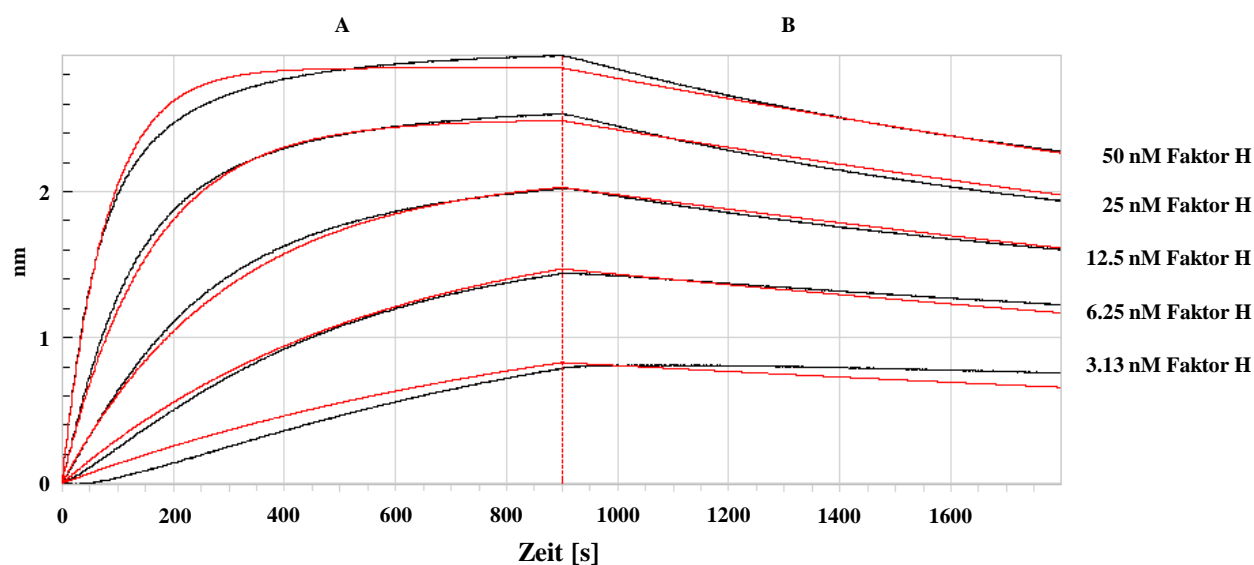


Abbildung 3.30 Darstellung des Bindungsverhaltens von NbFH-2-17-1 mit Faktor H. Zur Berechnung der kinetischen Konstanten wurden die Messungen der fünf dargestellten Faktor H-Konzentrationen verwendet. Bei den schwarzen Linien handelt es sich um die Messdaten, die roten Linien sind durch ein *Fitting* (vgl. 2.2.2.9) entstanden. A: Assoziationsschritt. B: Dissoziationsschritt.

Durch die Auswertung des Assoziations- und Dissoziationsschrittes wurde die konzentrationsabhängige Affinität von dem immobilisierten Nanobody NbFH-2-17-1 an Faktor H gezeigt. Mit Hilfe dieser Daten wurden die kinetischen Konstanten berechnet, welche in der Tabelle 3.12 aufgeführt sind.

Tabelle 3.12 Kinetische Konstanten von der Binding zwischen dem Nanobody NbFH-2-17-1 und Faktor H.

k_a (1/Ms)	k_a Fehler	k_d (1/s)	k_d Fehler	K_D (M)	K_D Fehler
2.47×10^5	6.90×10^2	2.55×10^{-4}	1.13×10^{-6}	1.04×10^{-9}	5.43×10^{-12}

Der bestimmte K_D -Wert von 1.04×10^{-9} M bestätigt, dass der Nanobody NbFH-2-17-1 hochaffin an Faktor H bindet. Die Bindungsstärke ist vergleichbar mit der von konventionellen Antikörpern, die mit einer hohen Affinität an ein Antigen binden (Cummins *et al.*, 2014). Die Herstellung des hochaffinen Einzeldomänenantikörpers wurde maßgeblich durch eine vorherige Immunisierung des Alpaka/Lama-Hybrids begünstigt (Lavinder *et al.*, 2014). Als nächstes wurden die hergestellten Nanobodies in einem *in vivo* Experiment verwendet, um ihre Wirkung auf die Entwicklung der Plasmodien im Darm von weiblichen *Anopheles*-Mücken zu untersuchen.

3.2.4. Ergebnisse des Transmission-Blocking-Assays

Um die Wirksamkeit der Nanobodies zur Inhibierung des Entwicklungszyklus von Plasmodien zu untersuchen, wurde ein Transmission-Blocking-Assay durchgeführt (2.2.6.3). Simon *et al.* (2013) zeigte durch ein Fütterungsexperiment von weiblichen *Anopheles stephensi* Mücken mit einem Ansatz aus Gametozyten, normalem menschlichem Serum, frischen menschlichen Erythrozyten und monoklonalen Anti-Faktor H-Antikörpern, dass eine Infektion der Mücken mit den Malariaerregern verhindert wurde. Eine generelle Strategie von mikrobiellen Pathogenen zur Vermeidung einer Reaktion des menschlichen Immunsystems ist die Bindung von regulatorischen Proteinen des Komplementsystems, um damit menschliche Zellen nachzuahmen (Zipfel *et al.*, 2007). Während Plasmodien innerhalb der Erythrozyten vor dem Immunsystem geschützt sind, verlassen sie zur sexuellen Reproduktion im Mitteldarm der Mücke die roten Blutkörperchen und müssen sich dort gegen den alternativen Weg des menschlichen Komplementsystems verteidigen. Dazu binden die Malariaerreger an ihrer Oberfläche Faktor H. Auf Grund der Anti-Faktor H-Antikörper im Fütterungsansatz wurde das regulatorische Protein inaktiviert und die Plasmodien wurden durch das menschliche Komplementsystem lysiert (Simon *et al.*, 2013). Deswegen wurde zunächst eine mögliche inhibitorische Wirkung der Nanobodies NbFH-2-17-1, NbFH-2-20-2, NbFH-2-5-1, NbFH-2-10-1 und NbFH-2-15-4 auf den Lebenszyklus der Plasmodien untersucht. Dazu wurden den weiblichen Mücken die jeweiligen Einzeldomänenantikörper (vgl. Tabelle 3.11) anstelle des Anti-Faktor H-Antikörpers in einer höchstmöglichen Konzentration zusammen mit dem Fütterungsansatz verabreicht. Da die Konzentrationen variierten, wurden zwei Kontrollproben mit unterschiedlichen Konzentrationen an normalem Kaninchenserum (NKS) verwendet. Die Ergebnisse der Auswertung des Transmission-Blocking-Assays sind in tabellarischer (Tabelle 3.13) und in grafischer Form (Abbildung 3.31) dargestellt.

Tabelle 3.13 Auswertung des ersten Transmission-Blocking-Assays. Nach dem Fütterungsexperiment wurden die Oocysten im Mitteldarm der weiblichen *Anopheles*-Mücken ausgezählt. Die Infektionsrate wurde berechnet, indem die Anzahl der infizierten durch die Gesamtzahl der eingesetzten Mücken dividiert wurde. Der Mittelwert der Oocystenanzahl wurde zusammen mit der Standardabweichung aufgeführt. Der Bereich zeigt die minimale und maximale Anzahl der gefundenen Oocysten pro Mücke. Als Kontrollen wurden normales Kaninchenserum (NKS) in zwei verschiedenen Konzentrationen und PBS verwendet.

Nummerierung der Mücken	PBS	NKS-I (4.2 mg/ml)	NKS-II (0.7 mg/ml)	NbFH-2-17-1 (0.8 mg/ml)	NbFH-2-20-2 (4.4 mg/ml)	NbFH-2-5-1 (2.1 mg/ml)	NbFH-2-10-1 (1.0 mg/ml)	NbFH-2-15-4 (0.2 mg/ml)
1	1	15	10	12	4	5	0	1
2	0	3	7	7	16	5	4	1
3	1	7	7	3	8	6	8	14
4	0	23	1	1	6	8	1	15
5	2	5	3	3	9	5	0	7
6	0	6	11	1	6	0	7	8
7	0	0	0	0	0	4	3	8
8	0	6	3	1	5	15	2	6
9	3	4	11	6	9	5	1	4
10	5	6	2	7	4	3	8	9
11	5	6	1	3	2	21	2	
12	4	9	10	2	4	2	1	
13		7	4		4	3	1	
14		3	5		5	7	0	
15		1	10		8	7		
16		16	7		6			
17			2					
Infektionsrate	58 %	94 %	94 %	92 %	94 %	93 %	79 %	100 %
Mittelwert der Oocystenanzahl	2±2	7±6	6±4	4±3	6±4	6±5	3±3	7±4
Bereich	0-5	0-23	0-11	0-12	0-16	0-21	0-8	1-15

Die Kontrollen mit normalem Kaninchenserum (NKS-I und NKS-II) wurden zur Überprüfung durchgeführt, ob unspezifische Antikörper einen Effekt auf die Inhibition der Plasmodienentwicklung haben könnten. Eine bessere Kontrolle wäre das normale Serum eines Alpaka/Lama-Hybrids gewesen, da im Kaninchenserum keine Schwerekettenantikörper vorkommen. Ausgehend der in Tabelle 3.13 aufgeführten Daten wurde die Abbildung 3.31 erstellt.

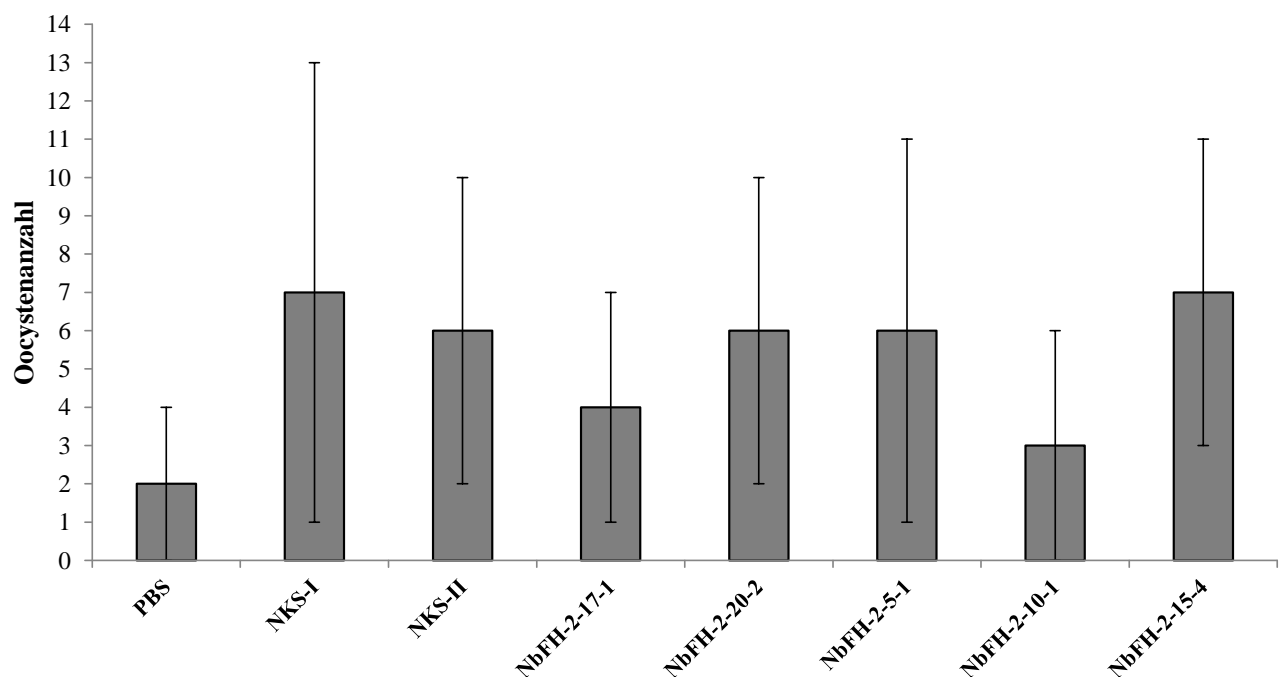


Abbildung 3.31 Grafische Darstellung der Ergebnisse des ersten Transmission-Blocking-Assays. In dem Diagramm sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Oocystenanzahl in den Mitteldärmen aus Tabelle 3.13 dargestellt. Auf der Abszissenachse sind die untersuchten Nanobodies und die verwendeten Kontrollen, auf der Ordinatenachse die Anzahl der Oocysten aufgeführt. Nach der Durchführung eines t-Tests zeigten die beobachteten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Oocystenanzahl.

Die eingesetzte PBS-Kontrolle resultierte in der niedrigsten Infektionsrate von 58%, so dass der Transmission-Blocking-Assay auf Grund des Verdachts auf eine fehlerhafte Durchführung mit zwei Einzeldomänenantikörpern wiederholt wurde. Da bei der Verwendung des Nanobodies NbFH-2-10-1 eine Infektionsrate von 79% festgestellt wurde und somit ein möglicher Effekt auf die Inhibierung der Plasmodienentwicklung vorliegen könnte, wurden dieser Nanobody und der bisher noch nicht untersuchte Nanobody NbFH-3-36-5-1 in einem zweiten Transmission-Blocking-Assay analysiert. Die Ergebnisse des zweiten Fütterungsversuches sind in der Tabelle 3.14 und in der daraus resultierenden Abbildung 3.32 dargestellt.

Tabelle 3.14 Auswertung des zweiten Transmission-Blocking-Assays. Nach dem Fütterungsexperiment wurden die Oocysten im Mitteldarm der weiblichen *Anopheles*-Mücken ausgezählt. Die Infektionsrate wurde berechnet, indem die Anzahl der infizierten durch die Gesamtzahl der eingesetzten Mücken dividiert wurde. Der Mittelwert der Oocystenanzahl wurde zusammen mit der Standardabweichung aufgeführt. Der Bereich zeigt die minimale und maximale Anzahl der gefundenen Oocysten pro Mücke. Als Kontrollen wurden normales Kaninchenserum (NKS) in zwei verschiedenen Konzentrationen und PBS verwendet.

Nummerierung der Mücken	PBS	NKS-I (0.7 mg/ml)	NKS-II (0.18 mg/ml)	NbFH-2-10-1 (1 mg/ml)	NbFH-3-36-5-1 (0.05 mg/ml)
1	1	3	5	46	15
2	16	35	4	15	4
3	9	20	1	2	3
4	1	7	5	1	10
5	6	12	8	4	8
6	8	7	5	0	18
7	5	12	21	0	20
8	2	7	5	2	6
9	1	16	14	6	19
10	3	5	16	7	15
11	3	25	0		15
12	14	37	5		24
13	9	15	3		13
14	21	4	1		3
15	2	48	4		0
Infektionsrate	100 %	100 %	93 %	80 %	93 %
Mittelwert der Oocystenanzahl	7±6	17±13	6±6	8±13	12±7
Bereich	1-21	3-48	0-21	0-46	0-24

Auch hier wurden die in Tabelle 3.14 gezeigten Daten zur Oocystenanzahl grafisch aufbereitet (Abbildung 3.32).

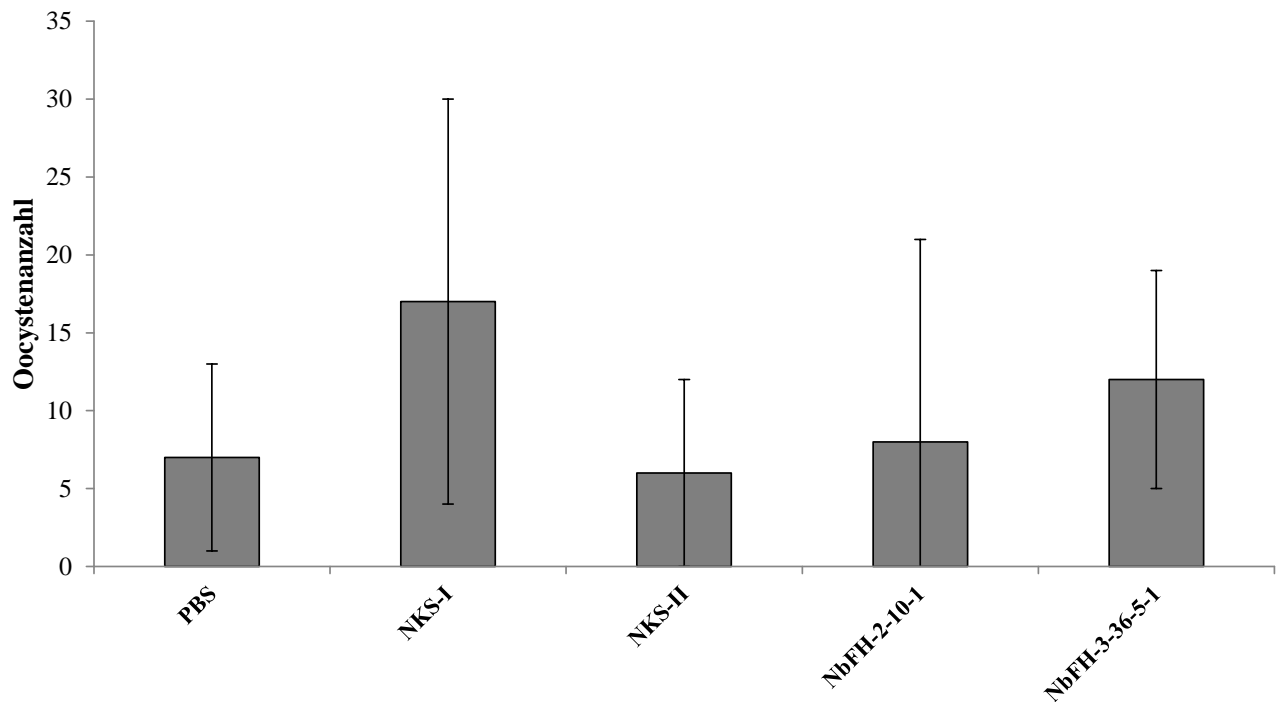


Abbildung 3.32 Grafische Darstellung der Ergebnisse des zweiten Transmission-Blocking-Assays. In dem Diagramm sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen von der Oocystenanzahl in den Mitteldärmen aus Tabelle 3.14 dargestellt. Auf der Abszissenachse sind die untersuchten Nanobodies und die verwendeten Kontrollen, auf der Ordinatenachse die Anzahl der Oocysten aufgeführt. Nach der Durchführung eines t-Tests zeigten die beobachteten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Oocystenanzahl.

In beiden Fütterungsexperimenten wurde gezeigt, dass die verwendeten Nanobodies keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf den Entwicklungszyklus der Plasmodien im Mitteldarm der Mücke aufweisen. Bei der entsprechenden Verwendung eines Anti-Faktor H-Antikörpers (0.25 mg/ml) wurden keine Oocysten im Mitteldarm festgestellt, so dass die Infektionsrate 0% betrug. Der dabei verwendete monoklonale, murine Antikörper 131x bindet an den Faktor H-Bereich CCP8-CCP15 (Simon *et al.*, 2013), so dass eine der drei C3b-Bindungsstellen funktionell inaktiviert wurde (Oppermann *et al.*, 2006). Da die Bindung von Faktor H durch das Oberflächenprotein PfGAP50 vorrangig über die Bereiche CCP5-CCP7 an der Zelloberfläche der Plasmodien stattfindet (Simon *et al.*, 2013), wäre eine Interaktion der Nanobodies mit diesem Bereich für die Lyse der Plasmodien durch den alternativen Weg des Komplementsystems von Vorteil. Auch zeigte Oppermann *et al.* (2006), dass die Bindung eines monoklonalen Antikörpers mit der Faktor H-Region CCP20 die Ligandeninteraktion und die Bindung an Zellen komplett blockierte. Deswegen ist der Bindungsort der Nanobodies essentiell für den inhibitorischen Effekt und kann ein Grund für die fehlende Wirkung im Transmission-Blocking-Assay sein. Um die Epitope der unterschiedlichen Nanobodies zu identifizieren, müsste eine Epitopkartierung durchgeführt werden. Diese Kartierung würde durch

Verwendung eines etablierten Systems zur Herstellung von rekombinanten Deletionsmutanten von Faktor H (Kühn und Zipfel, 1995) erfolgen. Nach der Produktion der Faktor H-Fragmente könnte eine Affinitätsuntersuchung der unterschiedlichen Einzeldomänenantikörper mit den jeweiligen Fragmenten durchgeführt werden. Durch die Immunisierung eines Alpaka/Lama-Hybrids mit den rekombinanten Faktor H-Fragmenten, die entweder an der Bindung mit PfGAP50 beteiligt oder für die regulativen Funktionen verantwortlich sind, wäre es wahrscheinlicher, mittels Phagen-Display hochaffine Nanobodies gegen die entsprechenden Bereiche zu identifizieren. Durch Verwendung dieser Einzeldomänenantikörper könnten die Plasmodien nicht mehr Faktor H binden und würden durch die Bildung von Membran-Angriffskomplexen lysiert werden.

Beim Panning wurden Kavitäten von ELISA-Platten mit Faktor H beschichtet (2.2.5.2), um Phagen zu selektieren, die Nanobodies mit einer hohen Affinität zum Antigen präsentieren. Dabei erfolgt die passive Adsorption der Proteine an der Oberfläche aus Polystyrol durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Proteinstrukturen und der Plastikmatrix (Crowther, 2000). Durch die Adsorption kann eine teilweise oder komplette Denaturierung der Proteine stattfinden, so dass deren Strukturen und native Eigenschaften verändert werden können (Butler, 2000). Dieses Problem ist während der Durchführung eines klassischen ELISAs unbedeutend, weil immer ein Teil der Proteine im nativen Zustand und somit zur Detektion verbleibt. Durch Strukturveränderungen kann es aber während des Pannings zu einer vermehrten Selektion von Nanobodies kommen, welche an die Epitope denaturierter Antigene binden (Chames *et al.*, 2002). Im Falle einer Denaturierung von Faktor H bei der Immobilisierung, könnten die selektierten und hergestellten VHHs eine hohe Affinität zu denaturierten Epitope aufweisen. Damit würden die Einzeldomänenantikörper im *in vivo* Fütterungsversuch nicht an den nativen Faktor H binden, so dass keine Inhibierung der Plasmodienentwicklung erfolgen würde. Bei der Analyse des Bindungsverhaltens von NbFH-2-17-1 mittels Bio-Layer-Interferometrie (3.2.3) wurde jedoch gezeigt, dass dieser Einzeldomänenantikörper eine hohe Affinität zu einem nativen Epitop von Faktor H aufweist. Damit liegt die Ursache des fehlenden inhibitorischen Effekts nicht daran, dass der Nanobody NbFH-2-17-1 an eine denaturierte Region des Antigens bindet. Um die Denaturierung von Proteinen durch Adhäsion an Plastikoberflächen zu verhindern, haben sich mehrere Methoden etabliert. So ist es zum Beispiel möglich, dass die Zielproteine biotinyliert werden, um anschließend durch Bindung an Streptavidin immobilisiert zu werden (Henderikx *et al.*, 1998). Auch können monoklonale Antikörper, welche an einer Plastikoberfläche immobilisiert werden und an das Zielprotein binden, zur Präsentation des Antigens während des Phagen-Displays verwendet werden (Verheesen *et al.*, 2006).

Im Darmmilieu der Mücke liegen ein pH-Wert von 7.5-7.6 und eine Temperatur von 24°C bis 34°C vor (Angrisano *et al.*, 2012), die Bestimmung des K_D -Werts des Einzeldomänenantikörpers wurde bei einem pH-Wert von 7.5 und einer Temperatur von 37°C (2.2.2.9) durchgeführt. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass der Nanobody Nb-2-17-1 auch unter diesen abiotischen Faktoren im Darm der Mücke an Faktor H bindet. Zur genaueren Bestimmung des VHH-Bindungsverhaltens im Mückendarm müsste eine Analyse durch Bio-Layer-Interferometrie mit den entsprechenden Parametern durchgeführt werden.

Ein weiterer Grund für den fehlenden Effekt der Nanobodies auf die Entwicklung der Plasmodien könnte deren molekulare Masse sein. Da ein Einzeldomänenantikörper mit ungefähr 15 kDa (vgl. Tabelle 3.10) relativ klein im Vergleich zum 155 kDa großen Faktor H (Vik *et al.*, 1990) ist, könnten die sterischen Auswirkungen durch die Interaktion des Nanobodys mit dem Antigen zu gering sein, um die Bindung von Faktor H an das Oberflächenprotein PfGAP50 der Plasmodien zu blockieren. Im Gegensatz dazu können konventionelle IgG-Antikörper nach Bindung des Antigens die Interaktion mit anderen Proteinen durch sterische Effekte unterbinden (Lien und Lowman, 2008). Deswegen wurde mit Hilfe eines pflanzlichen Expressionssystems ein Fusionsprotein produziert, welches aus dem Nanobody NbFH-2-17-1 und dem menschlichen Fc-Teil eines IgG1-Antikörpers bestand.

3.2.5. Produktion des Fusionsproteins NbFH-2-17-1-Fc in *Nicotiana benthamiana*

Die generierten Anti-Faktor H-Nanobodies zeigten im Transmission-Blocking-Assay keinen Einfluss auf die Plasmodienentwicklung im Mitteldarm der Mücke. Ein Grund dafür könnte ihre geringe molekulare Masse sein, so dass die Bindung von Faktor H an PfGAP50 nicht durch sterische Effekte blockiert werden konnte. Auch können Nanobodies nicht die komplementabhängige Zytolyse initiieren (Harmsen und De Haard, 2007). So könnte durch die Verwendung eines Fusionsproteins, welches aus dem Nanobody Nb-2-17-1 und einem menschlichen Fc-Teil besteht, die Zellyse der Plasmodien durch den klassischen Weg des menschlichen Komplementsystems ausgelöst werden. Dazu müssten die VHH-Fc-Antikörper mit Faktor H interagieren, welches schon an der Oberfläche der Gameten gebunden ist. Nachdem weibliche *Anopheles stephensi*-Mücken mit menschlichem Serum gefüttert wurden, ist der klassische Weg des menschlichen Komplementsystems im Mitteldarm nur wenig aktiv (Simon *et al.*, 2013). Wurden zum Fütterungsansatz jedoch monoklonale Antikörper gegeben, die an das im sexuellen Stadium der Plasmodien präsente Oberflächenprotein Pfs230 binden, erfolgte eine Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems (Simon *et al.*, 2013). Auch wurde in einem *in vitro* Experiment nachgewiesen, dass die gleichen Antikörper die komplementabhängige Zytolyse der Plasmodien durch Bindung an Pfs230 initiieren (Healer *et al.*, 1997).

Demzufolge wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. Stefan Bohn in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heribert Warzecha an der Technischen Universität Darmstadt die Klonierung des Konstrukts pNbFH-2-17-1-Fc-6141#3 durchgeführt. Dazu wurde die cDNA-Sequenz des Nanobodies NbFH-2-17-1 mit der cDNA eines humanen IgG1-Fc-Teils in den Vektor pICH10990 kloniert (Bohn, 2014). Die schematische Darstellung des Konstrukts und des entsprechenden Fusionsproteins ist jeweils Abbildung 3.33 dargestellt. Durch Ausbildung Disulfidbrücken in der Hinge-Region entstehen stabile, bivalente Homodimere (De Buck *et al.*, 2013). Für die unglykosylierten Proteinvarianten wurden molekulare Massen von 82.28 kDa (assembliertes Homodimer) und 41.14 kDa (Monomer) berechnet.

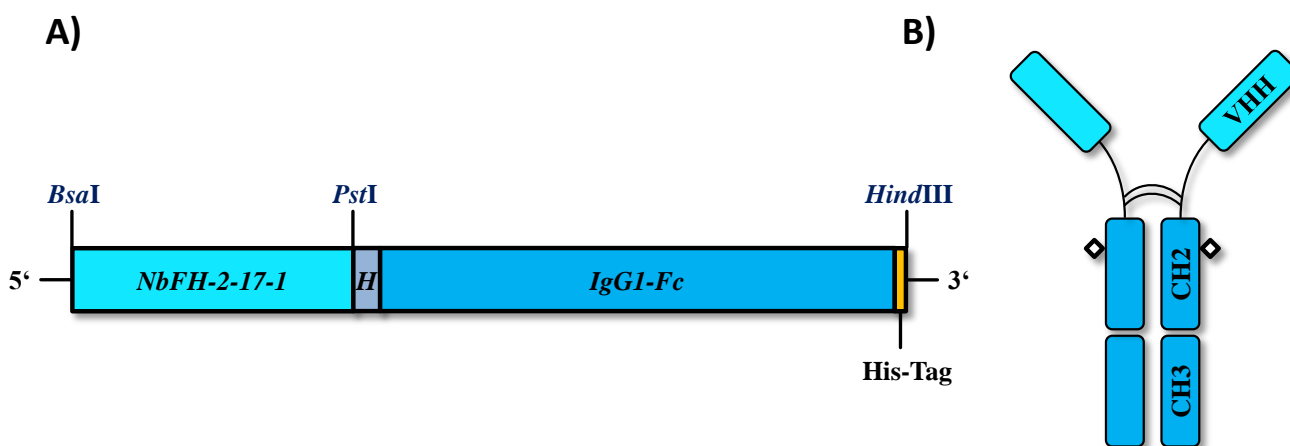


Abbildung 3.33 Schematische Darstellung des Konstrukts NbFH-2-17-1-Fc und eines Homodimers (in Anlehnung an Rissiek *et al.*, 2014). A) Am 5'-Ende des Konstrukts befindet sich die Sequenz des Nanobodys NbFH-2-17-1, die über eine Hinge-Sequenz mit der cDNA des menschlichen IgG1-Fc-Teils verbunden ist. Am 3'-Ende liegt die Sequenz eines His-Tags vor, welches zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie verwendet wurde. Die abgebildeten Schnittstellen wurden zur schrittweisen Klonierung in den Vektor pICH10990 benutzt. Auf Grund der *PstI*-Schnittstelle befinden sich die zusätzlichen Aminosäuren Leucin und Glutamin zwischen der VHH- und der Hinge-Sequenz des Proteins. H: Hinge-Region. Fc: *crystallisable fragment* B) Schematische Darstellung eines Homodimers aus zwei Fusionsproteinen. Die beiden Monomere sind durch zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Die Glykosylierungsstellen sind als Rauten dargestellt. VHH: *Variable domain of camelid heavy chain antibody*. CH: *Constant domain of heavy chain* (humaner IgG1-Antikörper).

Auf Grund der ineffizienten Produktion von bivalenten Antikörpern in *Escherichia coli* (De Buck *et al.*, 2013) und der potentiell hohen Ausbeute immunologisch aktiver Proteine in Tabakpflanzen erfolgte die Herstellung des Fusionsproteins mit Hilfe des Expressionssystems von Icon Genetics (Halle) (2.2.3.2). Marillonnet *et al.* (2009) zeigten, dass durch die Infiltration von *Nicotiana benthamiana*-Blättern mit einer Agrobaktériensuspension eine transiente, virale Expression in fast 100% der Mesophyllzellen erreicht werden konnte. So wurde auch rekombinantes GFP mit einem

Anteil von 80% am löslichen Gesamtproteingehalt und einer Ausbeute von 5 g pro Kilogramm frischer Biomasse produziert (Marillonnet *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurden bereits Nanobodies mit einem Anteil von 30% am löslichen Gesamtproteingehalt in *Nicotiana benthamiana* transient hergestellt (Teh und Kavanagh, 2010). Auch produzierten Giritch *et al.* (2006) mit dem Icon-System einen menschlichen, monoklonalen IgG1-Antikörper mit einer Ausbeute von 0.5 g pro Kilogramm frischer Biomasse.

Die Produktion des NbFH-2-17-1-Fc-Fusionsproteins wurde entweder mit dem 5'-Modul des Vektors pICH20030 oder mit dem 5'-Modul von pICH17620 durchgeführt. Durch die Verwendung der unterschiedlichen Module wurden die Proteine entweder in die Chloroplasten oder in das endoplasmatische Retikulum und anschließend in den Apoplast transportiert. Die Infiltration der Tabakpflanzen erfolgte mit Hilfe eines schwachen Vakuums, da dieses Verfahren die höchsten Ausbeuten an rekombinanten Proteinen nach viraler Genexpression ermöglicht (Marillonnet, *et al.* 2005). Die Infiltration der Kontrollpflanzen zur transienten Produktion von GFP erfolgte hingegen mittels Tuberkulinspritzen. Die Ernte orientierte sich an der Fluoreszenzintensität der Blätter von Kontrollpflanzen und erfolgte sieben Tage nach der Infiltration. Dazu wurde das Blattmaterial mehrerer Pflanzen unter flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend vereinigt. In Abbildung 3.34 ist die pflanzliche Produktion der Fusionsproteine mit unterschiedlichen 5'-Modulen durch eine Analyse mittels SDS-PAGE (2.2.2.1) und Western Blot (2.2.2.3) dargestellt.

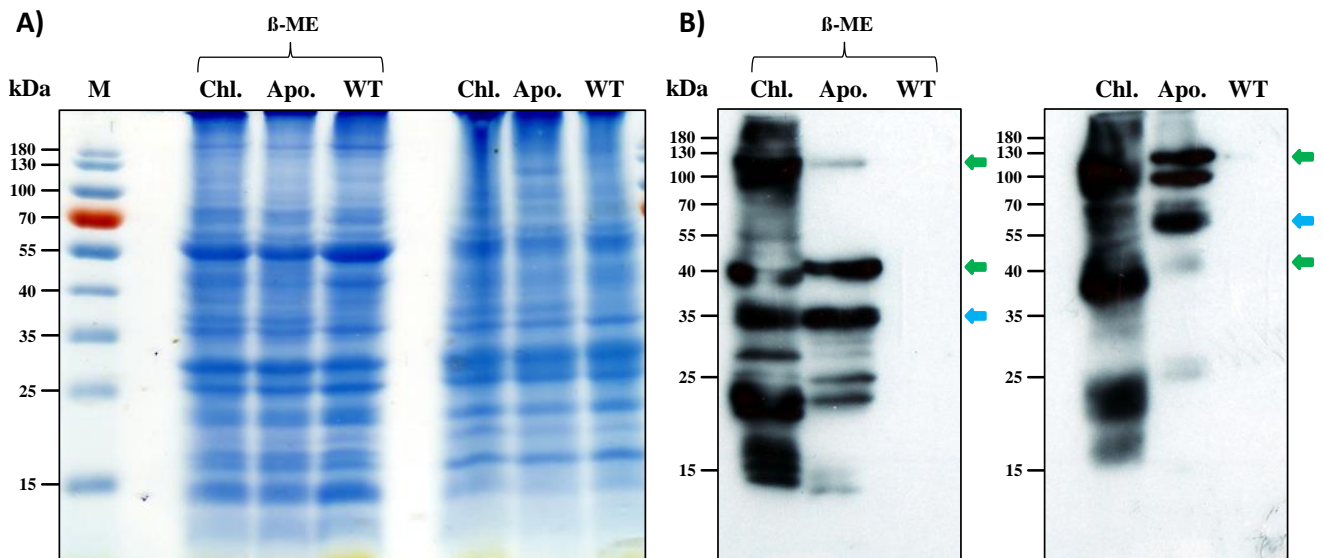


Abbildung 3.34 SDS-Polyacrylamidgel und Western Blot zur Analyse der transienten Produktion von NbFH-2-17-1-Fc in *Nicotiana benthamiana*. Die Herstellung des VHH-Fc-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des viralen Expressionssystems von Icon Genetics (Halle). A) Zur Analyse der Produktion des Fusionsproteins wurden 25 µl jeder Probe mit einem 13% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. B) Des Weiteren wurden die gleichen Proben durch ein weiteres SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Zur Detektion wurden murine Anti-His-HRP-Antikörper verwendet. Chl.: Verwendung des 5'-Moduls pICH20030 zum Transport des Fusionsproteins in den Chloroplasten. Apo.: Verwendung des 5'-Moduls pICH17620 zum Transport des Fusionsproteins in das endoplasmatische Retikulum und anschließend in den apoplastischen Raum. WT: Kontrollpflanze, die nur mit Icon-Puffer infiltriert wurde. β-ME: Proben, die zur Reduzierung von Disulfidbrücken mit β-Mercaptoethanol versetzt wurden. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies). Die grünen Pfeile verweisen auf homodimere und monomere Formen der rekombinanten Proteine. Die blauen Pfeile markieren Fc-Teile, von denen die Nanobodies abgespalten wurden (Richard *et al.*, 2013). Weitere Erklärungen sind im Text aufgeführt.

Richard *et al.* (2013) produzierten mit dem Icon-System ebenfalls in *Nicotiana benthamiana* ein Nanobody-Fc-Fusionsprotein, dass zur *in vivo* Neutralisation von α-Cobratoxin verwendet werden sollte. Dabei wurden die rekombinanten Proteine durch eine angefügte KDEL-Sequenz im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten. Nach einer gelelektrophoretischen Analyse der aufgereinigten Proteine wurden unerwartete Banden detektiert, so dass die entsprechenden Proteine mittels Edman-Abbau N-terminal sequenziert wurden. Daher war es möglich, in Anlehnung an die Forschungsergebnisse von Richard *et al.* (2013) die Banden der Western Blot-Analyse (vgl. Abbildung 3.34) zu interpretieren. Im Folgenden werden zunächst die Proben beschrieben, bei denen die rekombinanten Proteine in den Apoplast transportiert wurden. Bei der Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurde eine schwache Bande der assemblierten VHH-Fc-Antikörper bei ungefähr 120 kDa detektiert, da anscheinend nicht alle Disulfidbrücken gespalten worden waren.

Dabei ist der große Unterschied zur berechneten molekularen Masse von 82.28 kDa charakteristisch bei der SDS-PAGE von großen Multimeren (Richard *et al.*, 2013). Bei der Bande von ungefähr 40 kDa handelte es sich um die reduzierte monomere Form des Fusionsproteins. Die ermittelte Größe stimmte auch mit der vorhergesagten molekularen Masse von 41.14 kDa überein. Die Proteinbande bei ca. 35 kDa bestand aus monomeren Fc-Regionen, von denen die Nanobodies abgespalten worden waren (Richard *et al.*, 2013). Ein Grund für die Degradation könnte sein, dass bei Antikörpern die Hinge-Region und in der Nähe liegende Sequenzen besonders anfällig für die hydrolytische Spaltung durch Proteasen sind (De Muynck *et al.*, 2009). Bei den Banden unterhalb von 25 kDa handelte es sich um Proteindegradationen, die während des Extraktionsprozesses entstanden sein könnten (Richard *et al.*, 2013). Nach der Auftrennung der Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen und einer anschließenden Western Blot-Analyse wurden die VHH-Fc-Antikörper bei ungefähr 120 kDa detektiert. Bei den zusätzlichen Banden von ca. 100 kDa und 25 kDa handelte es sich um Degradationsprodukte des Fusionsproteins (Richard *et al.*, 2013). Die monomere Form war mit einer schwachen Bande bei ungefähr 40 kDa identifizierbar. Bei der Proteinbande zwischen 70 kDa und 55 kDa handelte es sich um assemblierte Fc-Regionen, welche von den VHH-Fc-Antikörpern abgespalten wurden (Richard *et al.*, 2013). Ein Vergleich der beiden Western Blots zeigte die erfolgreiche Ausbildung von Disulfidbrücken und die Generierung der Homodimere. Ausgehend von der Bandenintensität auf dem entwickelten Röntgenfilm waren ungefähr ein Drittel der rekombinanten Proteine assemblierte VHH-Fc-Antikörper. Diese Schätzung entsprach auch ungefähr der densitometrischen Analyse von Richard *et al.* (2013), die einen Anteil von 39% ermittelten. Des Weiteren scheint der Ursprung des Fc-Teils maßgeblich für die Degradation und die proteolytische Anfälligkeit des Fusionsproteins verantwortlich zu sein. De Buck *et al.* (2013) untersuchten die Produktion von VHH-Fc-Antikörpern in *Arabidopsis thaliana*-Samen, bei denen jeweils der gleiche Nanobody mit unterschiedlichen Fc-Teilen fusioniert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die Verwendung eines murinen IgG3-Fc-Teils eine geringere Degradation als der Einsatz eines humanen IgG1-Fc-Teils hatte. Auch führen die verwendete Pflanzenart, das Pflanzengewebe und der Entwicklungszustand der Pflanze zu einer unterschiedlichen Aktivierung von Proteasen und damit zu einer unterschiedlich ausgeprägten Degradation des rekombinanten Proteins (Loos *et al.*, 2011). Zusätzlich bestimmen die spezifischen Eigenschaften der subzellulären Kompartimente, wie das Redoxpotential, die Verfügbarkeit von Chaperonen und Foldasen, der pH-Wert und die Anwesenheit von Glycosyltransferasen und proteolytisch aktiven Enzymen, maßgeblich den Erfolg der Produktion, die Ausbeute und die Funktionalität der rekombinanten Proteine (Teh und Kavanagh, 2010).

Die Auswertung der Produktion des NbFH-2-17-1-Fc-Fusionsproteins mit einem N-terminalen Transitpeptid für den Transport in Chloroplasten zeigte eine sehr starke Degradation des

rekombinanten Proteins. So war es zwar möglich, assemblierte Homodimere (grüner Pfeil bei ca. 110 kDa), Monomere (grüner Pfeil bei ca. 40 kDa) und assemblierte Fc-Teile ohne fusionierte Nanobodies (blauer Pfeil) zu identifizieren, jedoch wurden auch sehr viele abgebaute Antikörperfragmente mit Hilfe der Anti-His-HRP-Antikörper detektiert. Ein möglicher Grund dafür könnte die fehlende Glykosylierung der rekombinanten Proteine auf Grund des direkten Transports in die Chloroplasten sein. Die kovalent verknüpften Oligosaccharide leisten einen wichtigen Beitrag zur Faltung, Stabilität, Konformation und Löslichkeit von IgG1-Antikörpern (Bosch *et al.*, 2013). So zeigte Zheng *et al.* (2011), dass deglykosylierte IgG1-Antikörper eine geringere Stabilität als die glykosylierte Form aufwiesen. Auch wurde wahrscheinlich die Konformation der CH2-Domäne durch die fehlenden Zuckerreste soweit verändert, dass die Erreichbarkeit der Hinge-Region für Proteasen erhöht wurde (Zheng *et al.*, 2011). Obwohl die Glykosylierungsmuster von Glykoproteinen eine hohe Heterogenität aufweisen, liegen die entsprechenden biosynthetischen Wege in allen eukaryotischen Lebewesen auf molekularer Ebene größtenteils konserviert vor (Bosch *et al.*, 2013). Dabei sind die pflanzliche und tierische Glykosylierung am Anfang gleich, unterscheiden sich aber im späteren Verlauf der Prozessierung (De Muynck *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in *Nicotiana benthamiana* hergestellte und mit einem pflanzlichen Glykosylierungsmuster ausgestattete Antikörper trotzdem C1q binden (Lai *et al.*, 2010) und damit den klassischen Weg des menschlichen Komplementsystems initiieren können. Das Protein C1q ist der erste Bestandteil zur Bildung des C1-Komplexes, der durch weitere Aktivierung des Komplementsystems zur Lyse der markierten Zellen führt (Sarma und Ward, 2011). Da in Pflanzen hergestellte Antikörper schlechter C1q binden als menschliche (Lai *et al.*, 2010), können zur Generierung eines menschenähnlichen Glykosylierungsmusters genetisch veränderte Pflanzen verwendet werden, bei denen Gene für die Glycansynthese eliminiert oder herunterreguliert wurden. So hergestellte Antikörper wiesen in biologischen Aktivitätstests eine normale Antigenbindung und Aktivierung der komplementabhängigen Zytolyse auf (Bosch *et al.*, 2013).

Ausgehend von den Ergebnissen der Western Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die transiente Produktion der VHH-Fc-Fusionsproteine mit Hilfe von *Nicotiana benthamiana* möglich ist. Der sekretorische Weg scheint also zu einer korrekten Faltung und Assemblierung von Antikörperderivaten und der Bildung von essentiellen Disulfidbrücken zu führen (Teh und Kavanagh, 2010), wenn auch die Fusionsproteine zum Teil proteolytisch abgebaut wurden. Dabei wurde die geringste Degradierung durch die Verwendung der Signalsequenz zum Transport in das endoplasmatische Retikulum erreicht.

Als nächstes wurde das lösliche Gesamtprotein aus den Tabakblättern extrahiert (2.2.3.6), um die VHH-Fc-Antikörper mittels Affinitätschromatographie (2.2.2.6) aufzureinigen. Zur Elution wurden drei Schritte mit je 250 mM Imidazol durchgeführt. Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden die Fusionsproteine der Elution 1 mit Hilfe der „Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 10K Devices“ (Merck-Millipore) in PBS überführt und konzentriert (2.2.2.7). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.35 dargestellt.

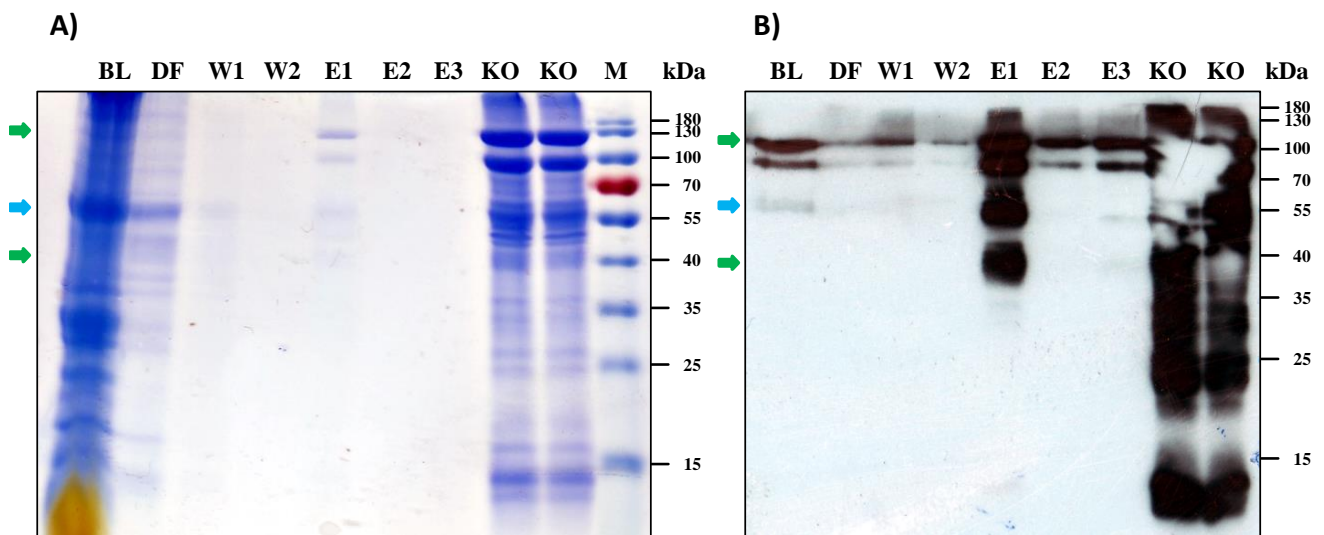


Abbildung 3.35 Polyacrylamidgel und Western Blot zur Analyse der Aufreinigung von NbFH-2-17-1-Fc. A) Zur Analyse der Aufreinigung, Umpufferung und Konzentrierung der Fusionsproteine wurden 25 µl jeder Probe mit einem 13% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. B) Des Weiteren wurden die gleichen Proben mit einem zweiten Gel aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blot analysiert. Zur Detektion wurden murine Anti-His-HRP-Antikörper verwendet. BL: Blattmaterial. KO: Konzentrierte und umpufferete Elutionsfraktion 1. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies). Schritte der Affinitätschromatographie: DF: Durchfluss. W1: Waschfraktion 1. W2: Waschfraktion 2. E1: Elutionsfraktion 1. E2: Elutionsfraktion 2. E3: Elutionsfraktion 3. Die grünen Pfeile verweisen auf homodimere und monomere Formen der rekombinanten Proteine. Die blauen Pfeile markieren Fc-Teile, von denen die Nanobodies abgespalten wurden (Richard *et al.*, 2013). Weitere Erklärungen sind im Text aufgeführt.

Sowohl bei den Fraktionen der Aufreinigungsschritte als auch bei den Proben der konzentrierten VHH-Fc-Antikörper waren assemblierte Homodimere (grüner Pfeil bei ca. 110 kDa), Monomere (grüner Pfeil bei ca. 40 kDa) und assemblierte Fc-Teile ohne fusionierte Nanobodies (blauer Pfeil) identifizierbar (Richard *et al.*, 2013). Auffällig war die starke Degradation der rekombinanten Proteine nach der Umpufferung und Konzentrierung. So war nach der Western Blot-Analyse der Elutionsfraktion 1 das gleiche Bandenmuster wie bei der Untersuchung von transgenem Blattmaterial zu erkennen (vgl. Abbildung 3.34). Damit scheint der Proteinabbau nach der Extraktion, der Aufreinigung und Konzentrierung stattgefunden zu haben. Zur Vermeidung der Proteindegradation

können die pulverisierten Blätter anstelle von AEBSF mit „cOmplete™ Protease Inhibitor“ (Roche Diagnostics) zur Inhibierung von unterschiedlichen Proteasegruppen versetzt werden (De Meyer *et al.*, 2015). Auch kann die Proteinlösung nach Umpufferung und Konzentrierung (2.2.2.7) zur Sterilfiltration durch eine 0.22 µm Nitrozellulosemembran filtriert werden (Richard *et al.*, 2013). Außerdem sollte die Proteinextraktion schnell ausgeführt werden (Laing und Christeller, 2004), da viele proteolytische Enzyme in subzellulären Komponenten vorhanden sind (Hehle *et al.*, 2015). Bei den 55 kDa Banden der Durchflussfraktion (DF) und der Waschschriftfraktion 1 (W1) handelte es sich um die großen Untereinheiten von RuBisCO (Ribulose-1.5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase), die auch deutlich in Abbildung 3.34 zu erkennen sind (Ma *et al.*, 2009). Dort befanden sich auch nach der Aufreinigung der NbFH-2-17-1-Fc-Fusionsproteine die assemblierten Fc-Regionen, von denen die Nanobodies abgespalten worden waren (Richard *et al.*, 2013).

Nach der Aufreinigung und Konzentrierung wurde die VHH-Fc-Antikörper-Lösung zur Durchführung eines qualitativen ELISAs verwendet (2.2.2.4), da sowohl monomere als auch dimere Formen anhand der SDS-PAGE und Western Blot-Analyse nachweisbar waren (Abbildung 3.35). Dazu wurden je drei Kavitäten einer ELISA-Platte mit einer Faktor H-Lösung und zum Vergleich drei Kavitäten mit PBS beschichtet. In jede dieser Kavitäten wurden 100 µl einer 1:2000 Verdünnung der NbFH-2-17-1-Fc-Lösung und zum Vergleich eine 1:2000 Verdünnung der NbFH-2-17-1-Lösung (vgl. Tabelle 3.11) gegeben. Zur Kontrolle des Bindungsverhaltens der Anti-His-HRP-Antikörper wurden anstelle der in Pflanzen hergestellten Proteine nur 100 µl PBS in die Kavitäten gegeben. Die Ergebnisse des ELISAs sind in Abbildung 3.36 aufgeführt.

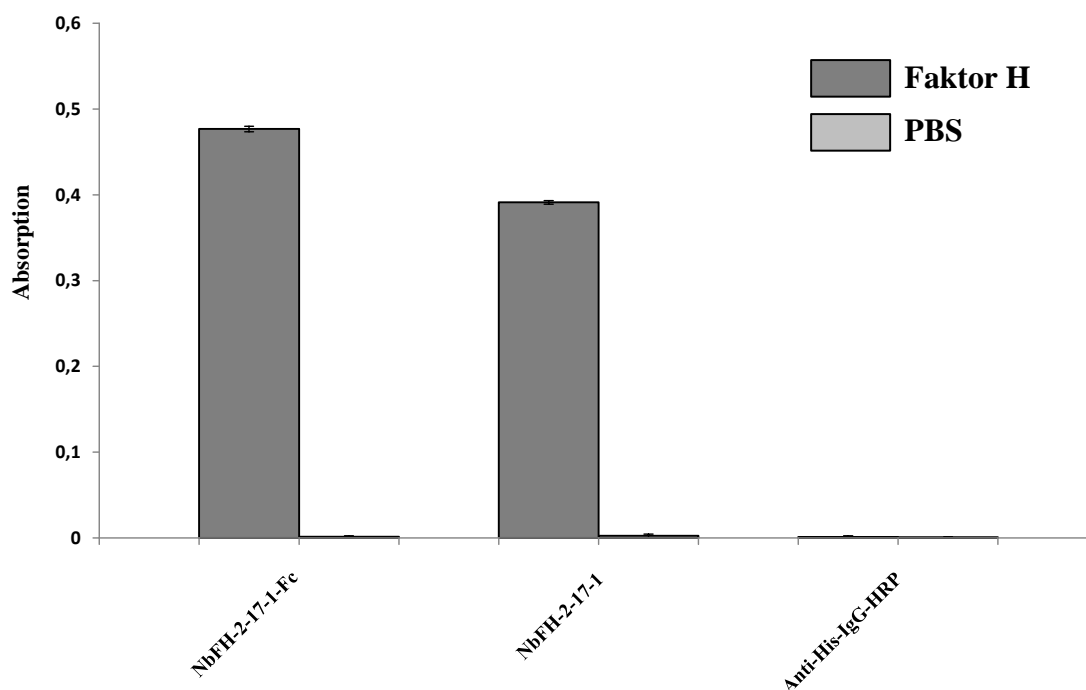


Abbildung 3.36 Ergebnisse des ELISAs zur Charakterisierung der Bindungsaffinität des NbFH-2-17-1-Fc-Antikörpers zu Faktor H. Zur Durchführung des qualitativen ELISAs wurden jeweils 100 µl von 1:2000 Verdünnungen der NbFH-2-17-1-Lösung und der NbFH-2-17-1-Fc-Lösung verwendet. Für jede untersuchte Probe sind jeweils zwei Balken dargestellt. Der dunkelgraue Balken zeigt die Absorption des Farbstoffes in Kavitäten, die mit Faktor H beschichtet wurden. Der hellgraue Balken zeigt die Absorption in Kavitäten, welche zuvor mit PBS inkubiert wurden. In dem Balkendiagramm sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen von den Messungen der Triplikate dargestellt. Von den Mittelwerten der Messdaten sind bereits die Mittelwerte der PBS-Kontrolle abgezogen. Bei der Kontrolle Anti-His-IgG-HRP wurde anstatt der Nanobody- bzw. Fusionsproteinlösung PBS verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte nach 17 Minuten bei 450 nm.

Die Auswertung des ELISAs zeigt, dass trotz der Degradation der Fusionsproteine ausreichend viele funktionale VHH-Fc-Antikörper vorhanden waren. Auch wurde eine eindeutige Affinität zu Faktor H nachgewiesen, die im qualitativen Vergleich dem Bindungsverhalten des Nanobodies NbFH-2-17-1 ähnelte. Zum direkten Vergleich der Affinitäten müsste jeweils die gleiche Anzahl an rekombinanten Proteinen eingesetzt werden. Dieses war jedoch nicht möglich, da die Konzentration des Fusionsproteins auf Grund des starken proteolytischen Abbaus nicht verlässlich bestimmt werden konnte. Durch die Verwendung der Anti-His-IgG-HRP-Kontrolle wurde nachgewiesen, dass der murine Antikörper keine Affinität zu Faktor H oder den Magermilchproteinen besaß.

Die bivalenten VHH-Sequenzen eines Homodimers können in einer verstärkten Antigen-Antikörper-Interaktion durch Aviditätseffekte resultieren (Ji *et al.*, 2013) und somit eine höhere Sensitivität als die

singulären Einzeldomänenantikörper in einem ELISA erreichen (De Meyer *et al.*, 2015). Des Weiteren besitzen *in planta* produzierte Antikörperfragmente und Antikörper die gleichen Bindungseigenschaften und Affinitäten zu Antigenen wie immunologisch aktive Proteine, die durch andere Produktionssysteme hergestellt wurden (De Buck *et al.*, 2012). Weiterhin sind die Bindungseigenschaften der Antikörper auch nicht vom Glykosylierungsstatus abhängig (De Meyer *et al.*, 2015).

Auf Grund der viralen Expression wurden zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus der rekombinanten Proteine angefügt, die aber keinen Einfluss auf die Affinität zu haben scheinen. Durch die Abspaltung der Chloroplasten-Signalsequenz blieben ein zusätzliches Alanin und ein Glycin und durch die Abspaltung der ER-Signalsequenz eine Glutaminsäure, ein Valin und ein Glycin zurück (Marillonnet, *et al.* 2004).

Des Weiteren charakterisierten Richard *et al.* (2013) die Bindung des VHH-Fc-Antikörpers an α -Cobratoxin und bestimmten eine Dissoziationskonstante von $5.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Damit wurde nachgewiesen, dass das Fusionsprotein mit einer vergleichbar hohen Affinität wie der entsprechende Einzeldomänenantikörper ($k_d = 1.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) an das Antigen gebunden hatte. Da der α -Cobratoxin-Nanobody (K_D -Wert=0.4 nM) eine ähnlich hohe Affinität wie NbFH-2-17-1 (K_D -Wert=1.04 nM) aufwies, ist eine entsprechend gute Bindung des NbFH-2-17-1-Fc-Antikörpers an Faktor H zu erwarten. Auf Grund der hohen *in vivo* Aktivität des α -Cobratoxin-VHH-Fc-Fusionsproteins (Richard *et al.*, 2013) sollte sich der hergestellte NbFH-2-17-1-Fc-Antikörper ebenfalls zur *in vivo* Inhibierung der Plasmodienentwicklung in einem Transmission-Blocking-Assay eignen.

Der nächste Schritt zur Überprüfung, ob die Applikation der NbFH-2-17-1-Fc-Antikörper an weibliche *Anopheles stephensi*-Mücken die Entwicklung der Plasmodien inhibieren könnte, wäre die Durchführung eines weiteren Fütterungsexperiments. Bei einer erfolgreichen komplementabhängigen Zytolyse der Malariaerreger könnte begonnen werden, die Antikörper zur Sekretion in den Nektar in Pflanzen zu produzieren. So stellten Helsper *et al.* (2011) GFP im Nektar von transgenen Tabakpflanzen (*Nicotiana langsdorffii* 'Weinm.' \times *Nicotiana sanderae*) mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ her. Zur Expression des Transgens wurde der Nektar-spezifische Promoter *pCarn2* (GenBank®-Nummer: HM584201.1) einer Nelke (*Dianthus caryophyllus*), eine *carn2*-Signalsequenz zur Sekretion in den Nektar und ein Terminator des *nopalinsynthase*-Gens verwendet (Helsper *et al.*, 2011). Das CARN2-Protein selbst akkumuliert im Nektar mit einer Konzentration von ungefähr 1 mg/ml (Helsper *et al.*, 2011). Durch die Verwendung des spezifischen Promoters wurde eine lokale Expression des Transgens im Nektarium erreicht, ohne dass eine Akkumulation des GFPs in benachbarten Geweben erfolgte (Helsper *et al.*, 2011).

Des Weiteren wurden polyklonale Antikörper gegen das Speicheldrüsenprotein CSPBP an *Anopheles*-Mücken verfüttert, so dass durch eine *in vivo*-Bindung an CSPBP die Sporozoiteninvasion der Speicheldrüsen um bis zu 90% reduziert werden konnte (Wang *et al.*, 2013). Daher scheint die orale Applikation von Nanobodies oder Nanobody-Fusionsproteinen mit einer Affinität zu Proteinen, die essentiell für die Entwicklung der Plasmodien sind, eine erfolgversprechende Strategie zur Reduzierung der Malariaübertragung auf den Menschen darzustellen.

4. Zusammenfassung

Malaria ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die durch Plasmodien hervorgerufen und von weiblichen Stechmücken der Gattung *Anopheles* auf den Menschen übertragen wird. Die Krankheit betrifft vor allem Einwohner tropischer und subtropischer Regionen und führte im Jahr 2013 weltweit zu ungefähr 584000 Todesopfern. Aufkommende Insektizidresistenzen der *Anopheles*-Mücken, Wirkstoffresistenzen der Plasmodien und das Fehlen effizienter Impfstoffe erschweren maßgeblich die globale Malariakontrolle. Da die konventionellen Methoden keinen nachhaltigen Erfolg bei der Verringerung der Malariaübertragung erzielen, wurden in dieser Arbeit die Grundlagen für zwei alternative Strategien gegen Malaria mit Hilfe transgener Pflanzen untersucht. Neben einer Blutmahlzeit zur Eierproduktion benötigen weibliche *Anopheles*-Mücken zum Überleben natürliche Zuckerquellen, welche primär aus floralem Pflanzennektar bestehen. Durch die Applikation von genetisch verändertem Nektar, der Wirkstoffe gegen die Entwicklung der Plasmodien innerhalb der Mücken enthält, könnte die Übertragung der Erreger auf Menschen verhindert werden. Dazu wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, ob die Produktion von doppelsträngiger RNA durch Tabakpflanzen eine Induzierung von RNA-Interferenz in den Speicheldrüsen der Mücken ermöglicht. Somit könnte die Expression von Genen, die für die Plasmodien zur Speicheldrüseninvasion essentiell sind, herunterreguliert werden. Hierfür wurden zunächst transgene Pflanzen generiert, die sequenzspezifische *hairpin*-RNAs (hpRNA) zur posttranskriptionellen Inhibierung der Expression des *apyrase*-Gens produzierten. Eine Applikation von Gesamt-RNA-Extrakten an weibliche *Anopheles*-Mücken zeigte nach einer Analyse mittels quantitativer Real-time-PCR jedoch keine Reduzierung der Genexpression. Ein möglicher Grund dafür könnte die geringe Konzentration der in Pflanzen produzierten hpRNAs sein. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, ob die orale Applikation von Nanobodies mit einer Affinität zu Faktor H zur Inhibierung der Plasmodienentwicklung im Mitteldarm der Mücken führen könnte. Die Malariaerreger müssen Faktor H binden, um einer Lyse durch den alternativen Weg des menschlichen Komplementsystems zu entgehen, welches nach der Blutmahlzeit immer noch im Verdauungstrakt des Insektes aktiv ist. Dazu wurden zunächst zwei Phagenbibliotheken mit Hilfe einer zur Verfügung gestellten cDNA-Bibliothek generiert, die aus Blutlymphozyten eines mit Faktor H immunisierten Alpaka/Lama-Hybrids hergestellt worden war. Mit Hilfe eines Phagen-Displays wurden sechs unterschiedliche Nanobodies identifiziert, die gegen Faktor H binden. Nach der Produktion der Nanobodies durch ein bakterielles Expressionssystem, erfolgte deren Charakterisierung mittels ELISA bezüglich ihrer Bindungseigenschaften zu Faktor H. Auf Grund der festgestellten Affinitäten wurde als nächstes mittels einer Analyse durch Bio-Layer-Interferometrie der K_D -Wert eines hochaffinen Nanobodies von

1.04×10^{-9} M festgestellt. Anschließend wurden alle *variable domains of camelid heavy chain antibodies* (VHHs) mit Hilfe von *in vivo* Fütterungsversuchen bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf den Lebenszyklus der Plasmodien untersucht. Dabei zeigte keiner der verwendeten Nanobodies einen signifikanten inhibitorischen Effekt. Die Gründe dafür könnten sein, dass möglicherweise keiner der Nanobodies an das für die Inhibition essentielle Epitop des Faktor Hs bindet oder dass aufgrund ihrer geringen Größe ein sterischer Effekt zur Blockierung der Bindung an die Malariaerreger ausbleibt. Daher wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Nanobody und einem humanen IgG1-Fc-Teil, mit Hilfe eines viralen Expressionssystems in Tabakpflanzen produziert. Anschließend wurde die Affinität des rekombinanten Proteins zu Faktor H mittels ELISA erfolgreich nachgewiesen. Als nächstes müsste das produzierte Fusionsprotein bezüglich seiner Wirkung auf die Entwicklung der Plasmodien mittels eines *in vivo* Fütterungsexperiments untersucht werden, um anschließend die Produktion in pflanzlichem Nektar durchzuführen. Damit könnte die orale Applikation von VHH-Fc-Fusionsproteinen durch genetisch veränderten Nektar an *Anopheles*-Mücken eine alternative Strategie zur Reduktion der Malariaübertragung auf den Menschen darstellen.

5. Summary

Malaria is a parasitic infectious disease caused by plasmodia and transmitted to the human via a bite of a female *Anopheles* mosquito. The disease mostly affects people in tropical and subtropical regions and, in 2013, caused approx. 584.000 fatalities worldwide. The global malaria control efforts are being consistently hampered due to insecticide resistance development among *Anopheles* mosquitos, multidrug-resistance of plasmodia and lack of an efficient vaccine. As the conventional methods fail to provide a sustainable reduction of malaria incidence, the aim of this work was to analyze the basic principles of two alternative strategies against the spread of the disease with the use of transgenic plants.

Beside their blood meal for the production of eggs, female *Anopheles* mosquitoes need to take up sugar from natural sources, mostly plant nectar. Through application of genetically altered nectar, containing drugs against the plasmodial development within the mosquitoes, the transmission of the pathogens to the human could be inhibited. Therefore, in the first part of this work, the potential of tobacco-produced double stranded RNA to induce RNA interference in the salivary glands of the mosquitoes was analyzed. Consequently, expression of genes essential for the plasmodia to invade the glands would be downregulated. Thus, transgenic plants producing sequence-specific hairpin RNAs for the post-transcriptional inhibition of the mosquito apyrase gene were generated. Application of total RNA extracts to female *Anopheles* mosquitoes indicated, after analysis by means of quantitative

real time PCR, no downregulation of this gene. One possible reason for this result could be low concentration of the plant-produced hpRNAs. Thus, in the second part of this work, the feasibility of oral application of nanobodies with an affinity to factor H to inhibit the development of the plasmodia within the midgut of the mosquitoes was investigated. The pathogens must bind factor H to evade an induced lysis by the alternative pathway of the human complement system, active in the intestinal tract of the insect following a blood meal. Hence, two phage display libraries were generated relying upon an available cDNA library constructed using lymphocytes of an alpaca/lama-hybrid immunized with factor H. Via phage display technology, six different factor H-binding nanobodies were identified. After production of the nanobodies relying on a bacterial expression system, they were characterized by ELISA regarding their binding properties to factor H. Initial confirmation of antigen-binding properties led to the ultimate determination of the K_D value of 1.04×10^{-9} M for a selected highly affine nanobody via bio-layer interferometry. Subsequently, all six variable domains of camelid heavy chain antibodies (VHHs) were tested in an *in vivo* transmission blocking assay regarding their inhibitory effect on the life cycle of the plasmodia. However, none of the nanobodies showed significant inhibitory impact. The result could stem from the probable absence of tethering capability of the VHHs to the epitope of factor H constituting the essential binding site for the inhibition of the plasmodial development. Another reason could be that due to their small size nanobodies lack the steric effect necessary for blocking the binding between factor H and the pathogens. Therefore, a fusion protein consisting of the selected nanobody and the human IgG1 Fc domain was produced via a viral-based expression system in tobacco plants. Afterwards, the affinity of the recombinant protein to factor H was verified by the use of ELISA. The next step to analyze the potential inhibitory effect on the plasmodial development would be the execution of another *in vivo* transmission blocking assay. After verification of their antimalarial impact, the fusion proteins should be produced in plant nectar. Thereby, oral ingestion of the VHH-Fc fusion proteins with transgenically altered nectar by the *Anopheles* mosquitoes could prove an alternative strategy for the reduction of the transmission of malaria to the human.

6. Literaturverzeichnis

Achan, J., Tibenderana, J. K., et al. (2009). "Effectiveness of quinine versus artemether-lumefantrine for treating uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children: randomised trial." British Medical Journal 339.

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., et al. (2003). "RNA interference: Biology, mechanism, and applications." Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4): 657.

Alonso, P. L. und Tanner, M. (2013). "Public health challenges and prospects for malaria control and elimination." Nature Medicine 19(2): 150-155.

Angrisano, F., Tan, Y. H., et al. (2012). "Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut - placing the *Plasmodium* ookinete centre stage." International Journal for Parasitology 42(6): 519-527.

Aranda, P. S., LaJoie, D. M., et al. (2012). "Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality." Electrophoresis 33(2): 366-369.

Barnard, A. C., Nijhof, A. M., et al. (2012). "RNAi in Arthropods: Insight into the Machinery and Applications for Understanding the Pathogen-Vector Interface." Genes 3(4): 702-741.

Baton, L. A. und Ranford-Cartwright, L. C. (2005). "Spreading the seeds of million-murdering death : metamorphoses of malaria in the mosquito." Trends in Parasitology 21(12): 573-580.

Baum, J., Papenfuss, A. T., et al. (2006). "Regulation of apicomplexan actin-based motility." Nature Reviews Microbiology 4(8): 621-628.

Baum, J. A., Bogaert, T., et al. (2007). "Control of coleopteran insect pests through RNA interference." Nature Biotechnology 25(11): 1322-1326.

Beier, M. S., Pumpuni, C. B. et al. (1994). "Effects of Para-Aminobenzoic Acid, Insulin, and Gentamicin on *Plasmodium falciparum*. Development in Anopheline Mosquitos (Diptera, Culicidae)." Journal of Medical Entomology 31(4): 561-565

-
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., et al. (2011).** "GenBank." Nucleic Acids Research 39: D32-D37.
- Bishop, A. und Gilchrist, B. M. (1946).** "Experiments Upon the Feeding of *Aedis aegypti* through Animal Membranes with a View to Applying This Method to the Chemotherapy of Malaria." Parasitology 37(1-2): 85-100.
- Birch, D. E. (1996).** "Simplified hot start PCR." Nature 381(6583): 630-630.
- Birnboim, H. C. und Doly, J (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNS. Nucl. Acids Res. 7. 1513-1523.
- Bohn, S. (2014).** "Produktion eines Anti-Malaria-Nanobodies in Tabak." Technische Universität Darmstadt, Bachelorarbeit.
- Boisson, B., Jacques, J. C., et al. (2006).** "Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi." Febs Letters 580(8): 1988-1992.
- Bosch, D., Castilho, A., et al. (2013).** "N-Glycosylation of Plant-produced Recombinant Proteins." Current Pharmaceutical Design 19(31): 5503-5512.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Bustin, S. A. (2002).** "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." Journal of Molecular Endocrinology 29(1).
- Butler, J. E. (2000).** "Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays." Methods 22(1): 4-23.
- Byakika-Kibwika, P., Lamorde, M., et al. (2011).** "Artemether-Lumefantrine Combination Therapy for Treatment of Uncomplicated Malaria: The Potential for Complex Interactions with Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Individuals." Malar Res Treat 2011: 703730.

Carmen, S. und L. Jermutus (2002). "Concepts in antibody phage display." *Brief Funct Genomic Proteomic* 1(2): 189-203.

Carthew, R. W. und Sontheimer, E. J. (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* 136(4): 642-655.

Cerutti, H. und Casas-Mollano, J. A. (2006). "On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man." *Current Genetics* 50(2): 81-99.

Chames, P., Hoogenboom, H. R., et al. (2002). "Selection of antibodies against biotinylated antigens." *Nanoproteomics:Methods and Protocols* 178: 147-157.

Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2): S3-S23.

Choi, J. H. und S. Y. Lee (2004). "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(5): 625-635.

Chothia, C. und Lesk, A. M. (1987). "Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins." *Journal of Molecular Biology* 196(4): 901-917.

Citovsky V. und Tzfira T. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 17:147–154.

Coleman, R. E., Sattabongkot, J., et al. (2006). "Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand." *Malaria Journal* 5.

Collins, W. E. und Jeffery, G. M. (2005). "*Plasmodium ovale*: Parasite and disease." *Clinical Microbiology Reviews* 18(3): 570.

Conrad, U., Plagmann, I., et al. (2011). "ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock." *Plant Biotechnology Journal* 9(1): 22-31.

-
- Conrath, K. E., Lauwereys, M., et al. (2001).** "beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(10): 2807-2812.
- Conrath, K. E., Wernery, U., et al. (2003).** "Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae." *Developmental and Comparative Immunology* 27(2): 87-103.
- Coy, M. R., Sanscrainte, N. D., et al. (2012).** "Gene silencing in adult *Aedes aegypti* mosquitoes through oral delivery of double-stranded RNA." *Journal of Applied Entomology* 136(10): 741-748.
- Crompton, P. D., Moebius, J., et al. (2014).** "Malaria Immunity in Man and Mosquito: Insights into Unsolved Mysteries of a Deadly Infectious Disease." *Annual Review of Immunology*, Vol 32 32: 157-187.
- Crowther, J. R. (2000).** "The ELISA guidebook." *Nanoproteomics:Methods and Protocols* 149: III-IV, 1-413. P. 46.
- Cummins, M., Dolezal, O., et al. (2014).** Kinetic Characterization of a Panel of High-Affinity Monoclonal Antibodies Targeting Ricin and Recombinant Re-Formatting for Biosensor Applications. *Antibodies*. 2014; 3(2):215-231.
- Cyrklaff, M., Sanchez, C. P., et al. (2011).** "Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Science* 334(6060): 1283-1286.
- Davidson, B. L. und McCray, P. B. (2011).** "Current prospects for RNA interference-based therapies." *Nature Reviews Genetics* 12(5): 329-340.
- Davies, J. und L. Riechmann (1996).** "Single antibody domains as small recognition units: Design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability." *Protein Engineering* 9(6): 531-537.
- De Buck, S., Nolf, J., et al. (2013).** "Fusion of an Fc chain to a VHH boosts the accumulation levels in *Arabidopsis* seeds." *Plant Biotechnology Journal* 11(8): 1006-1016.

De Buck, S., Viridi, V., et al. (2012). "Production of camel-like antibodies in plants." *Nanoproteomics:Methods and Protocols* 911: 305-324.

Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000). "The immune system - First of two parts." *New England Journal of Medicine* 343(1): 37-49.

Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000). "Advances in immunology: The immune system - Second of two parts." *New England Journal of Medicine* 343(2): 108-117.

De Meyer, T., Laukens, B., et al. (2015). "Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*." *Plant Biotechnology Journal*.

De Meyer, T., Muyldermans, S., et al. (2014). "Nanobody-based products as research and diagnostic tools." *Trends in Biotechnology* 32(5): 263-270.

De Muynck, B., Navarre, C., et al. (2009). "Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells." *Transgenic Research* 18(3): 467-482.

De Muynck, B., Navarre, C., et al. (2010). "Production of antibodies in plants: status after twenty years." *Plant Biotechnology Journal* 8(5): 529-563.

Djupedal, I. und Ekwall, K. (2009). "Epigenetics: heterochromatin meets RNAi." *Cell Research* 19(3): 282-295.

Dodds, A. W., Ren, X. D., et al. (1996). "The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4." *Nature* 379(6561): 177-179.

Elfawal, M. A., Towler, M. J., et al. (2012). "Dried Whole Plant *Artemisia annua* as an Antimalarial Therapy." *PLoS One* 7(12).

Ferreira, V. P., Pangburn, M. K., et al. (2010). "Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate." *Molecular Immunology* 47(13): 2187-2197.

Field, J., J. Nikawa, et al. (1988). "Purification of a Ras-Responsive Adenylyl Cyclase Complex from *Saccharomyces-Cerevisiae* by Use of an Epitope Addition Method." *Molecular and Cellular Biology* 8(5): 2159-2165.

Fire, A., S. Q. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-811.

Flick, K. und Chen, Q. J. (2004). "var genes, PfEMP1 and the human host." *Molecular and Biochemical Parasitology* 134(1): 3-9.

Florens, L., Washburn, M. P., et al. (2002). "A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle." *Nature* 419(6906): 520-526.

Fräbel, S. (2011). "Pflanzeninduziertes gene silencing in *Nosema ceranae*." Unveröffentlichte Daten. Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit.

Gardner, M. J., Hall, N., et al. (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Nature* 419(6906): 498-511.

Gan, S. D. und K. R. Patel (2013). "Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." *Journal of Investigative Dermatology* 133(9): E10-E12.

Garcia, C. R. S., Markus, R. P., et al. (2001). "Tertian and quartan fevers: Temporal regulation in malarial infection." *Journal of Biological Rhythms* 16(5): 436-443.

Garcia-Fruitos, E. (2010). "Inclusion bodies: a new concept." *Microbial Cell Factories* 9-80.

Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., et al. (2014). "Innate sensing of malaria parasites." *Nature Reviews Immunology* 14(11): 744-757.

Gelvin, S. B. (2003). "*Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool." *Microbiol Mol Biol Rev* 67(1): 16-37, table of contents.

Giritch, A., Marillonnet, S., et al. (2006). "Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(40): 14701-14706.

Ghahroudi, M. A., Desmyter, A., et al. (1997). "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." *Febs Letters* 414(3): 521-526.

Ghassabeh, G. H., Saerens, D. and Muyldermans, S. (2010). "Isolation of Antigen-Specific Nanobodies." *Antibody Engineering* Volume 2, 251-266. DOI: 10.1007/978-3-642-01147-4_20. Springer-Verlag (Berlin Heidelberg).

Ghosh, A. K., Devenport, M., et al. (2009). "Malaria Parasite Invasion of the Mosquito Salivary Gland Requires Interaction between the Plasmodium TRAP and the *Anopheles* Saglin Proteins." *Plos Pathogens* 5(1).

Ghosh, A. K. und Jacobs-Lorena, M. (2009). "*Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland." *Current Opinion in Microbiology* 12(4): 394-400.

Gleave, A. P. (1992). "A Versatile Binary Vector System with a T-DNA Organizational-Structure Conducive to Efficient Integration of Cloned DNA into the Plant Genome." *Plant Molecular Biology* 20(6): 1203-1207.

Grant, S. G. N., Jessee, J., et al. (1990). "Differential Plasmid Rescue from Transgenic Mouse Dnas into *Escherichia-Coli* Methylation-Restriction Mutants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(12): 4645-4649.

Green, R. und E. J. Rogers (2013). "Transformation of Chemically Competent *E. coli*." *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* 529: 329-336.

Gu, W. D., Muller, G., et al. (2011). "Natural Plant Sugar Sources of *Anopheles* Mosquitoes Strongly Impact Malaria Transmission Potential." *PLoS One* 6(1).

Hanahan, D. (1983). "Studies on Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166(4): 557-580.

-
- Harmsen, M. M. und De Haard, H. J. (2007).** "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(1): 13-22.
- Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., et al. (2000).** "Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features." *Molecular Immunology* 37(10): 579-590.
- Harwood, N. E. und Batista, F. D. (2010).** "Early Events in B Cell Activation." *Annual Review of Immunology*, Vol 28 28: 185-210.
- Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., et al. (2013).** "Nanobodies and their potential applications." *Nanomedicine* 8(6): 1013-1026
- Healer, J., McGuinness, D., et al. (1997).** "Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230." *Infection and Immunity* 65(8): 3017-3023.
- Hehle, V. K., Lombardi, R., et al. (2015).** "Site-specific proteolytic degradation of IgG monoclonal antibodies expressed in tobacco plants." *Plant Biotechnology Journal* 13(2): 235-245.
- Helsper, J. P. F. G., Ruyter-Spira, C. P., et al. (2011).** "Accumulation of human EGF in nectar of transformed plants of *Nicotiana langsdorffii* x *N. sanderae* and transfer to honey by bees." *Plant Biology* 13(5): 740-746.
- Henderikx, P., Kandilogiannaki, M., et al. (1998).** "Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma." *Cancer Research* 58(19): 4324-4332.
- Hoogenboom, H. R. (2005).** "Selecting and screening recombinant antibody libraries." *Nature Biotechnology* 23(9): 1105-1116.
- Huvenne, H. und Smagghe, G. (2010).** "Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review." *Journal of Insect Physiology* 56(3): 227-235.

-
- Ismaili, A., Jalali-Javaran, M., et al. (2007).** "Production and characterization of anti-(mucin MUCI) single-domain antibody in tobacco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi)." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47: 11-19.
- Ito, J., Ghosh, A., et al. (2002).** "Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite." *Nature* 417(6887): 452-455.
- Ivashuta, S., Zhang, Y. J., et al. (2015).** "Environmental RNAi in herbivorous insects." *Rna-a Publication of the Rna Society* 21(5): 840-850.
- Johnston, S. P., Pieniazek, N. J., et al. (2006).** "PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria." *Journal of Clinical Microbiology* 44(3): 1087-1089.
- Jerne, N. K. (1960).** "Immunological Speculations." *Annual Review of Microbiology* 14: 341-358.
- Ji, X. M., Lu, W. G., et al. (2013).** "Covalently dimerized Camelidae antihuman TNFa single-domain antibodies expressed in yeast *Pichia pastoris* show superior neutralizing activity." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(19): 8547-8558.
- Jiang, X. F., Peery, A., et al. (2014).** "Genome analysis of a major urban malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*." *Genome Biology* 15(9).
- Jiang, X. R., Song, A., et al. (2011).** "Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies." *Nature Reviews Drug Discovery* 10(2): 101-110.
- Kalthoff, D., Giritch, A., et al. (2010).** "Immunization with Plant-Expressed Hemagglutinin Protects Chickens from Lethal Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 Challenge Infection." *Journal of Virology* 84(22): 12002-12010.
- Karlsson, F., Borrebaeck, C. A. K., et al. (2003).** "The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TolA and phage protein 3 domains." *Journal of Bacteriology* 185(8): 2628-2634.

Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., Foeller, C. (1991). "Sequences of Proteins of Immunological Interest". DIANE Publishing.

Kanasty, R., Dorkin, J. R., et al. (2013). "Delivery materials for siRNA therapeutics." *Nature Materials* 12(11): 967-977.

Kappe, S. H. I., Buscaglia, C. A., et al. (2004). "Plasmodium sporozoite molecular cell biology." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 29-59.

Kehoe, J. W. und Kay, B. K. (2005). "Filamentous phage display in the new millennium." *Chemical Reviews* 105(11): 4056-4072.

Khattab, A., Barroso, M., et al. (2015). "Anopheles Midgut Epithelium Evades Human Complement Activity by Capturing Factor H from the Blood Meal." *Plos Neglected Tropical Diseases* 9(2).

Kola, V. S. R., Renuka, P., et al. (2015). "Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing." *Frontiers in Physiology* 6.

Komori, T., Imayama, T., et al. (2007). "Current status of binary vectors and superbinary vectors." *Plant Physiology* 145(4): 1155-1160.

Kumaran, J., C. R. Mackenzie, et al. (2012). "Semiautomated panning of naive camelidae libraries and selection of single-domain antibodies against peptide antigens." *Nanoproteomics:Methods and Protocols* 911: 105-124.

Kuhn, S. und P. F. Zipfel (1996). "Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H." *European Journal of Immunology* 26(10): 2383-2387.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4." *Nature* 227(5259): 680-685.

Lai, H. F., Engle, M., et al. (2010). "Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(6): 2419-2424.

Laing, W. und J. Christeller (2004). "Extraction of proteins from plant tissues." Curr Protoc Protein Sci Chapter 4: Unit 4 7.

Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and clustal X version 2.0." Bioinformatics 23(21): 2947-2948.

Lavinder, J. J., Wine, Y., et al. (2014). "Identification and characterization of the constituent human serum antibodies elicited by vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A 111(6): 2259-2264.

Lazo, G. R., Chao, S., et al. (2004). "Development of an expressed sequence tag (EST) resource for wheat (*Triticum aestivum* L.): EST generation, unigene analysis, probe selection and bioinformatics for a 16,000-locus bin-delineated map." Genetics 168(2): 585-593.

Lee, P. C., Chong, E. T. J., et al. (2015). "Molecular detection of human Plasmodium species in Sabah using PlasmoNex (TM) multiplex PCR and hydrolysis probes real-time PCR." Malaria Journal 14.

Leroux-Roels, G. (2010). "Unmet needs in modern vaccinology Adjuvants to improve the immune response." Vaccine 28: C25-C36.

Lien, S. und H. B. Lowman (2008). "Therapeutic anti-VEGF antibodies." Handb Exp Pharmacol(181): 131-150.

Lim, L. und McFadden, G. I. (2010). "The evolution, metabolism and functions of the apicoplast." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences 365(1541): 749-763.

Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method." Methods 25(4): 402-408.

Loos, A., Van Droogenbroeck, B., et al. (2011). "Production of monoclonal antibodies with a controlled N-glycosylation pattern in seeds of Arabidopsis thaliana." Plant Biotechnology Journal 9(2): 179-192.

Luzzatto, L. (2012). "Sickle cell anaemia and malaria." Mediterr J Hematol Infect Dis 4(1): e2012065.

Ma, Z., Cooper, C., et al. (2009). "A Study of Rubisco through Western Blotting and Tissue Printing Techniques." *Cbe-Life Sciences Education* 8(2): 140-146.

Maier, A. G., Cooke, B. M., et al. (2009). "Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte." *Nature Reviews Microbiology* 7(5): 341-354.

Mao, Y. B., Cai, W. J., et al. (2007). "Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol." *Nature Biotechnology* 25(11): 1307-1313.

Mao, Y. B., Tao, X. Y., et al. (2011). "Cotton plants expressing *CYP6AE14* double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms." *Transgenic Research* 20(3): 665-673.

Mattick, J. S. (2001). "Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity." *Embo Reports* 2(11): 986-991.

Mattick, J. S. (2003). "Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms." *Bioessays* 25(10): 930-939.

Matuschewski, K. (2006). "Getting infectious: formation and maturation of Plasmodium sporozoites in the Anopheles vector." *Cellular Microbiology* 8(10): 1547-1556.

Marillonnet, S., Giritch, A., et al. (2004). "In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(43): 15546-15546.

Marillonnet, S., Thoeringer, C., et al. (2005). "Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants." *Nature Biotechnology* 23(6): 718-723.

McGinnis, K. M. (2010). "RNAi for functional genomics in plants." *Briefings in Functional Genomics* 9(2): 111-117.

Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." *Nature* 449(7164): 819-826.

-
- Miller, L. H., Baruch, D. I., et al. (2002).** "The pathogenic basis of malaria." *Nature* 415(6872): 673-679.
- Muyldermans, S. (2013).** "Nanobodies: natural single-domain antibodies." *Annu Rev Biochem* 82: 775-797.
- Muyldermans, S. (2001).** "Single domain camel antibodies: current status." *J Biotechnol* 74(4): 277-302.
- Muyldermans, Atarhouch, S., T., et al. (1994).** "Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains." *Protein Eng* 7(9): 1129-1135.
- Mullis, K., Faloona, F., et al. (1986).** "Specific Enzymatic Amplification of DNA Invitro - the Polymerase Chain-Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Naito, Y., Yamada, T., et al. (2005).** "dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference." *Nucleic Acids Research* 33: W589-W591.
- Napoli, C., Lemieux, C., et al. (1990).** "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans." *Plant Cell* 2(4): 279-289.
- Nduati, E. W., Ng, D. H. L., et al. (2010).** "Distinct Kinetics of Memory B-Cell and Plasma-Cell Responses in Peripheral Blood Following a Blood-Stage Plasmodium chabaudi Infection in Mice." *PLoS One* 5(11).
- Nguyen, V., Hamers, K., R. et al. (2000).** "Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire." *Embo Journal* 19(5): 921-930.
- Nolan, T., Hands, R. E., et al. (2006).** "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nature Protocols* 1(3): 1559-1582.

Olafson, K. N., Ketchum, M. A., et al. (2015). "Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(16): 4946-4951.

Oppermann, M., Manuelian, T., et al. (2006). "The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein." *Clinical and Experimental Immunology* 144(2): 342-352.

Pace, C. N., F. Vajdos, et al. (1995). "How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein." *Protein Science* 4(11): 2411-2423.

Paldi, N., Glick, E., et al. (2010). "Effective Gene Silencing in a Microsporidian Parasite Associated with Honeybee (*Apis mellifera*) Colony Declines." *Applied and Environmental Microbiology* 76(17): 5960-5964.

Pardon, E., Laeremans, T., et al. (2014). "A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology." *Nature Protocols* 9(3): 674-693.

Parkin, J. und Cohen, B. (2001). "An overview of the immune system." *Lancet* 357(9270): 1777-1789.

Paschke, M. (2006). "Phage display systems and their applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* 70(1): 2-11.

Petrovsky, N. und J. C. Aguilar (2004). "Vaccine adjuvants: Current state and future trends." *Immunology and Cell Biology* 82(5): 488-496.

Piel, F. B., Patil, A. P., et al. (2010). "Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis." *Nature Communications* 1.

Plattner, F. und Soldati-Favre, D. (2008). "Hijacking of Host Cellular Functions by the Apicomplexa." *Annual Review of Microbiology* 62: 471-487.

Qi, H., H. Q. Lu, et al. (2012). "Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction." *Journal of Molecular Biology* 417(3): 129-143.

Richard, G., Meyers, A. J., et al. (2013). "In vivo neutralization of alpha-cobratoxin with high-affinity llama single-domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody." *PLoS One* 8(7): e69495.

Rissiek, B., F. Koch-Nolte, et al. (2014). "Nanobodies as modulators of inflammation: potential applications for acute brain injury." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.

Roberts, R. J. (2005). "How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(17): 5905-5908.

Sambade, A., Brandner, K., et al. (2008). "Transport of TMV Movement Protein Particles Associated with the Targeting of RNA to Plasmodesmata." *Traffic* 9(12): 2073-2088.

Sarkies, P. und Miska, E. A. (2014). "Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(8): 525-535.

Sarma, J. V. und Ward, P. A. (2011). "The complement system." *Cell and Tissue Research* 343(1): 227-235.

Sen, G. L. und Blau, H. M. (2006). "A brief history of RNAi: the silence of the genes." *Faseb Journal* 20(9): 1293-1299.

Sinden, R. E. und Billingsley, P. F. (2001). "Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove?" *Trends in Parasitology* 17(5): 209-211.

Singh, B. und Daneshvar, C. (2013). "Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*." *Clinical Microbiology Reviews* 26(2): 165-184.

Simon, N., Lasonder, E., et al. (2013). "Malaria Parasites Co-opt Human Factor H to Prevent Complement-Mediated Lysis in the Mosquito Midgut." *Cell Host & Microbe* 13(1): 29-41.

Siraj, A. S., Santos-Vega, M., et al. (2014). "Altitudinal Changes in Malaria Incidence in Highlands of Ethiopia and Colombia." *Science* 343(6175): 1154-1158.

Shandilya, A., Chacko, S., et al. (2013). "A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach." *Scientific Reports* 3.

Shafer, T. J., Meyer, D. A., et al. (2005). "Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs." *Environmental Health Perspectives* 113(2): 123-136.

Smith, G. P. (1985). "Filamentous Fusion Phage - Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface." *Science* 228(4705): 1315-1317.

Smith, J., Kontermann, R. E., et al. (2005). "Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis." *Faseb Journal* 19(3): 331-341.

Stratmann, T. und Kang, A. S. (2005). "Cognate peptide-receptor ligand mapping by directed phage display." *Proteome Sci* 3: 7.

Sullivan, D. J. (2002). "Theories on malarial pigment formation and quinoline action." *International Journal for Parasitology* 32(13): 1645-1653.

Tal, M., Silberstein, A., et al. (1985). "Why Does Coomassie Brilliant Blue-R Interact Differently with Different Proteins - a Partial Answer." *Journal of Biological Chemistry* 260(18): 9976-9980.

Teh, Y. H. A. und Kavanagh, T. A. (2010). "High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*." *Transgenic Research* 19(4): 575-586.

Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(5): 523-533.

Thomas, P. E., Klinger, R., et al. (2011). "Challenges in the association of human single nucleotide polymorphism mentions with unique database identifiers." *Bmc Bioinformatics* 12.

Towbin, H., Staehelin, T., et al. (1979). "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9): 4350-4354.

Turner, C. T., Davy, M. W. et al. (2006). "RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding." *Insect Molecular Biology* 15(3): 383-391.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., et al. (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis." *Biotechniques* 44(5): 619-626.

Verheesen, P., Roussis, A., et al. (2006). "Reliable and controllable antibody fragment selections from Camelid non-immune libraries for target validation." *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764(8): 1307-1319.

Verheesen, P. und Laeremans, T. (2012). "Selection by phage display of single domain antibodies specific to antigens in their native conformation." *Nanoproteomics:Methods and Protocols* 911: 81-104.

Vieira, J. und J. Messing (1987). "Production of single-stranded plasmid DNA." *Methods Enzymol* 153: 3-11.

Vik, D. P., Munozcanoves, P., et al. (1990). "Factor H." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 153: 147-162.

Viljoen, G. J., Nel, L. H., Crowther, J. R. (2005). "Molecular Diagnostic PCR Handbook" Springer Science+Business Media B.V.. Springer Netherlands. Edition 1: 3-56.

Vu, K. B., M. A. Ghahroudi, et al. (1997). "Comparison of llama V-H sequences from conventional and heavy chain antibodies." *Molecular Immunology* 34(16-17): 1121-1131.

Wang, W., Singh, S., et al. (2007). "Antibody structure, instability, and formulation." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(1): 1-26.

-
- Wang, M., Yi, X. Y., et al. (2005).** "Phage displaying peptides mimic schistosoma antigenic epitopes selected by rat natural antibodies and protective immunity induced by their immunization in mice." *World Journal of Gastroenterology* 11(19): 2960-2966.
- Wang, J. L., Zhang, Y., et al. (2013).** "*Anopheles gambiae* Circumsporozoite Protein-Binding Protein Facilitates *Plasmodium* Infection of Mosquito Salivary Glands." *Journal of Infectious Diseases* 208(7): 1161-1174.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., et al. (2001).** "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." *Plant Journal* 27(6): 581-590.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., et al. (2009).** "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity." *Medical Microbiology and Immunology* 198(3): 157-174.
- Williams, T. N., Mwangi, T. W., et al. (2005).** "An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait." *Plos Medicine* 2(5): 441-445.
- Wilson, J. L., Scott, I. M. und McMurry, J. L. (2010).** "Optical biosensing: Kinetics of protein A-IGG binding using biolayer interferometry." *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 38: 400–407.
- Wilson, R. C. und Doudna, J. A. (2013).** "Molecular Mechanisms of RNA Interference." *Annual Review of Biophysics*, Vol 42 42: 217-239.
- Winzeler, E. A. (2008).** "Malaria research in the post-genomic era." *Nature* 455(7214): 751-756.
- Wirth, D. F. (2002).** "The parasite genome: Biological revelations." *Nature* 419(6906): 495-496.
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., et al. (2014).** "Malaria." *Lancet* 383(9918): 723-735.
- WHO (2014).** "World Malaria Report 2014." Geneva, World Health Organization. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/ (Stand 23.07.2015).

WHO (2015). "Guidelines for the treatment of malaria." Geneva, World Health Organization. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/> (Stand 14.08.2015).

Whyard, S. (2015). "Plant science. Insecticidal RNA, the long and short of it." *Science* 347(6225): 950-951.

Whyard, S., Singh, A. D., et al. (2009). "Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(11): 824-832.

Wu, D., Li, G. X., et al. (2011). "Phage Displayed Peptides to Avian H5N1 Virus Distinguished the Virus from Other Viruses." *PLoS One* 6(8).

Younis, A., Siddique, M. I., et al. (2014). "RNA Interference (RNAi) Induced Gene Silencing: A Promising Approach of Hi-Tech Plant Breeding." *International Journal of Biological Sciences* 10(10): 1150-1158.

Wu, N., K. Matand, et al. (2010). "Enhancing DNA electrotransformation efficiency in *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells." *Electronic Journal of Biotechnology* 13(5).

Wu, T. T., Johnson, G., et al. (1993). "Length Distribution of CDRH3 in Antibodies." *Proteins-Structure Function and Genetics* 16(1): 1-7.

Zipfel, P. F., Wurzner, R., et al. (2007). "Complement evasion of pathogens: Common strategies are shared by diverse organisms." *Molecular Immunology* 44(16): 3850-3857.

Zell, R. und H. J. Fritz (1987). "DNA Mismatch-Repair in *Escherichia coli* Counteracting the Hydrolytic Deamination of 5-Methyl-Cytosine Residues." *Embo Journal* 6(6): 1809-1815.

Zhang, J., Cai, L., et al. (2008). "Transgene integration and organization in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome." *Transgenic Research* 17(2): 293-306.

Zhang, J., Khan, S. A., et al. (2015). "Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids." *Science* 347(6225): 991-994.

Zheng, K., Bantog, C., et al. (2011). "The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability." *Mabs* 3(6): 568-576.

Zhou, G. L., Kohlhepp, P., et al. (2007). "Fate of blood meal iron in mosquitoes." *Journal of Insect Physiology* 53(11): 1169-1178.

7. Anhang

7.1. Plasmidkarten

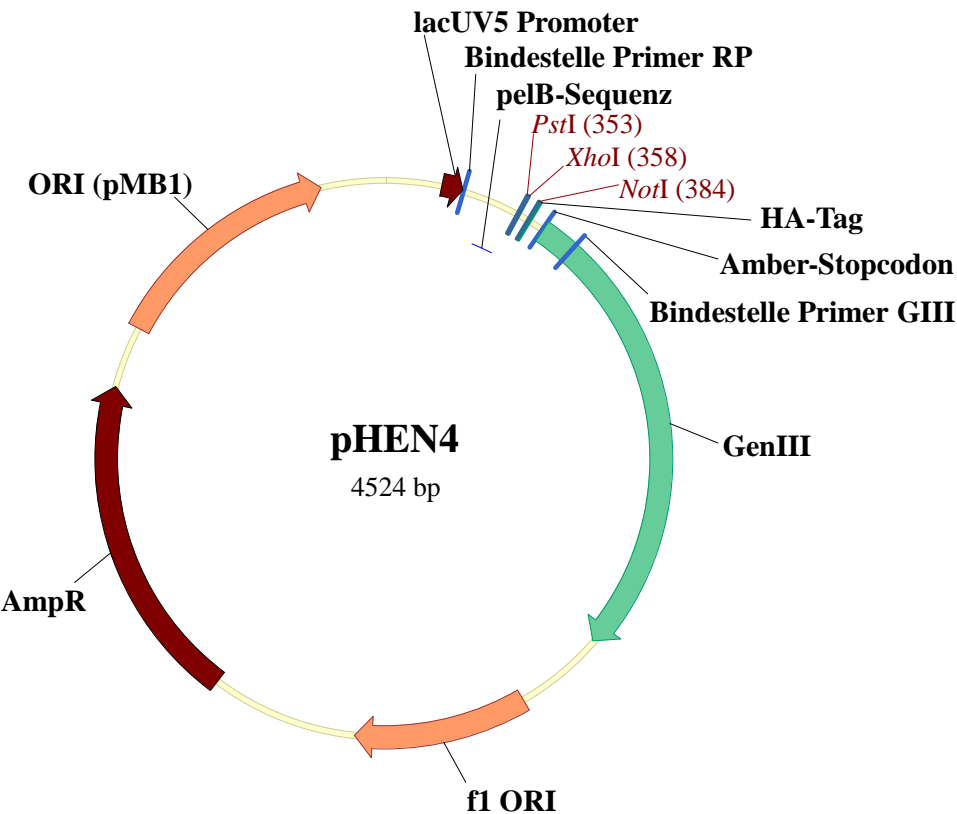


Abbildung 7.1 Plasmidkarte von pHEN4.

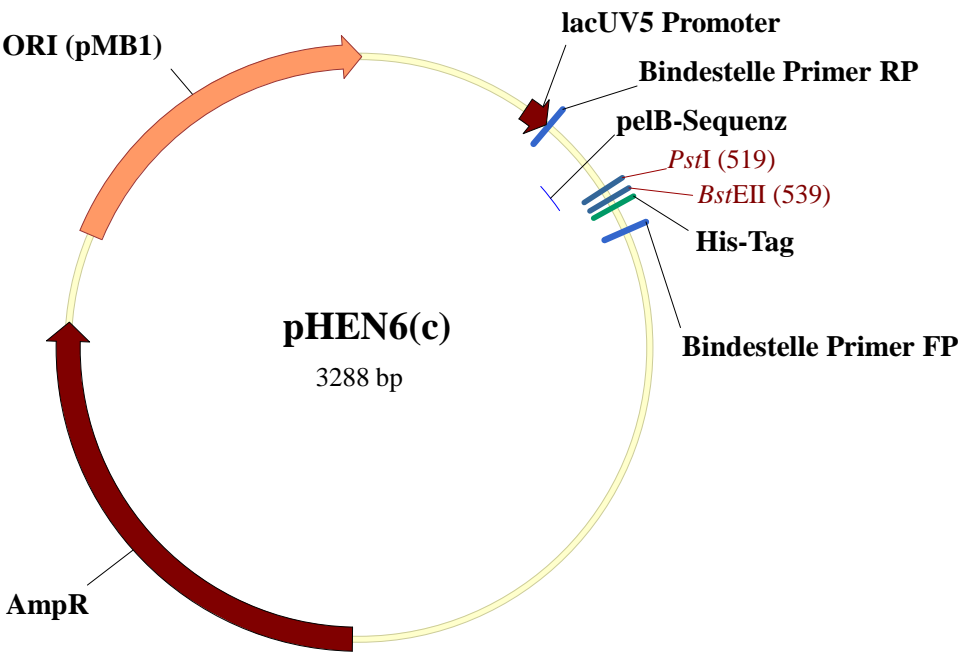


Abbildung 7.2 Plasmidkarte von pHEN6(c).

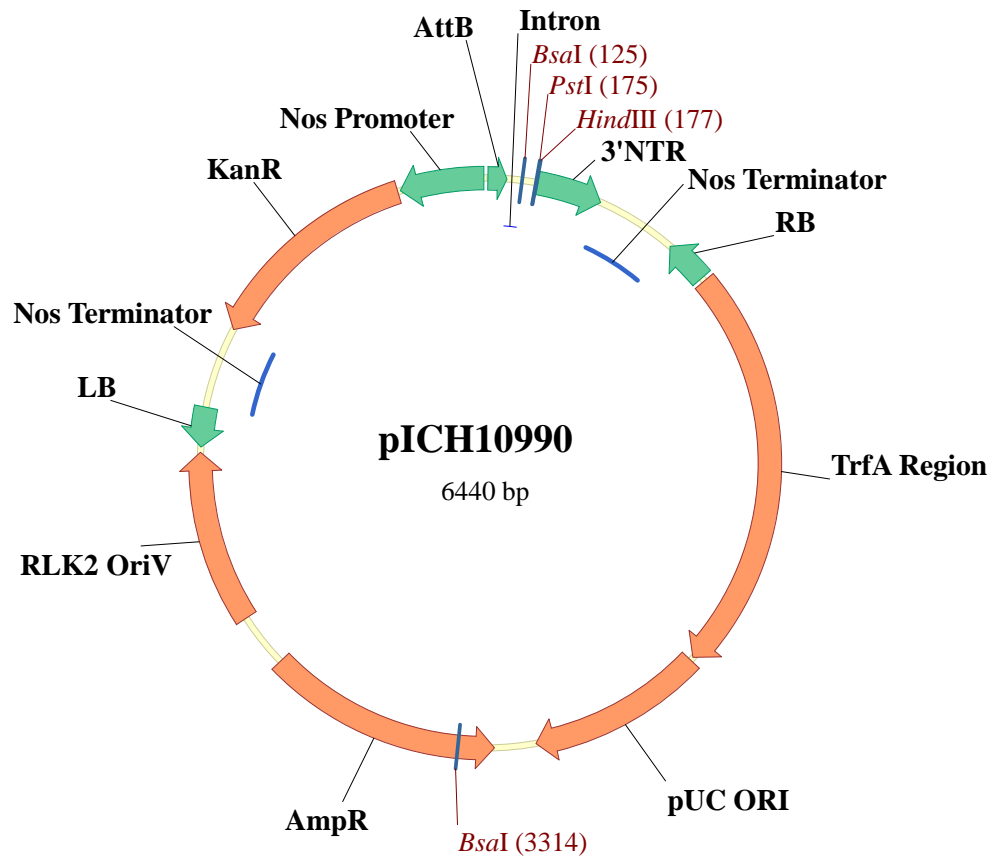


Abbildung 7.3 Plasmidkarte von pICH10990.

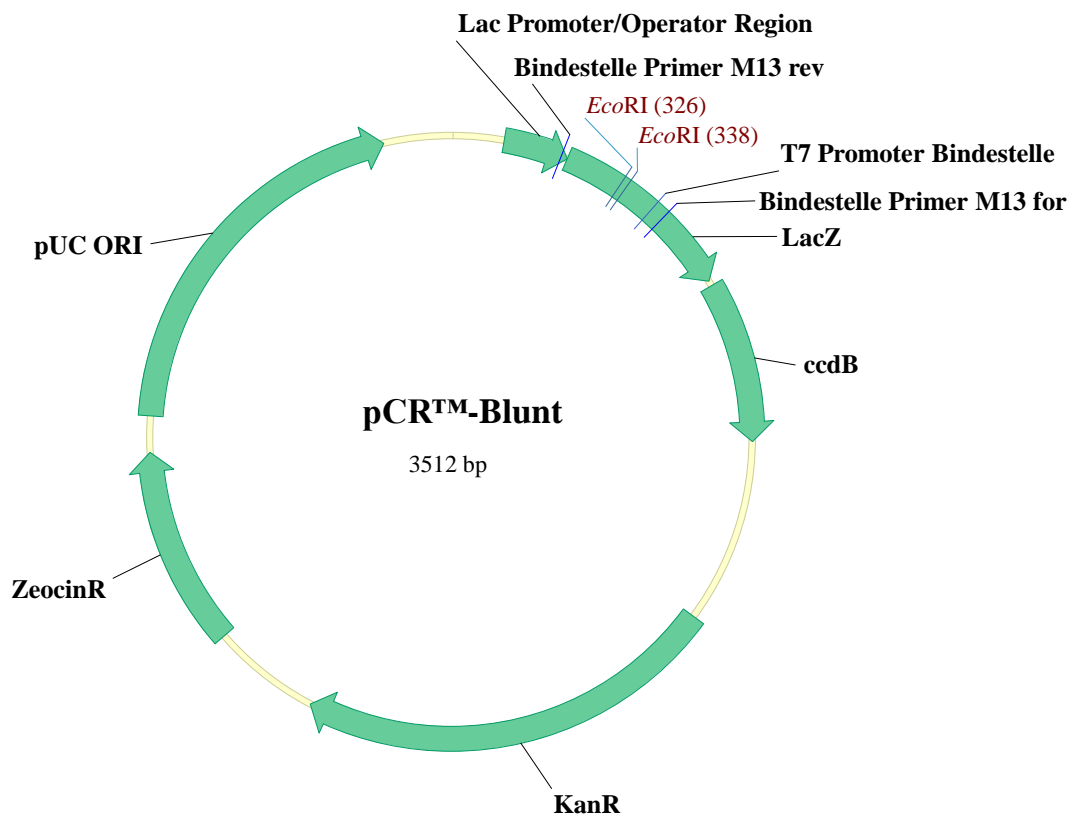


Abbildung 7.4 Plasmidkarte von pCR™-Blunt.

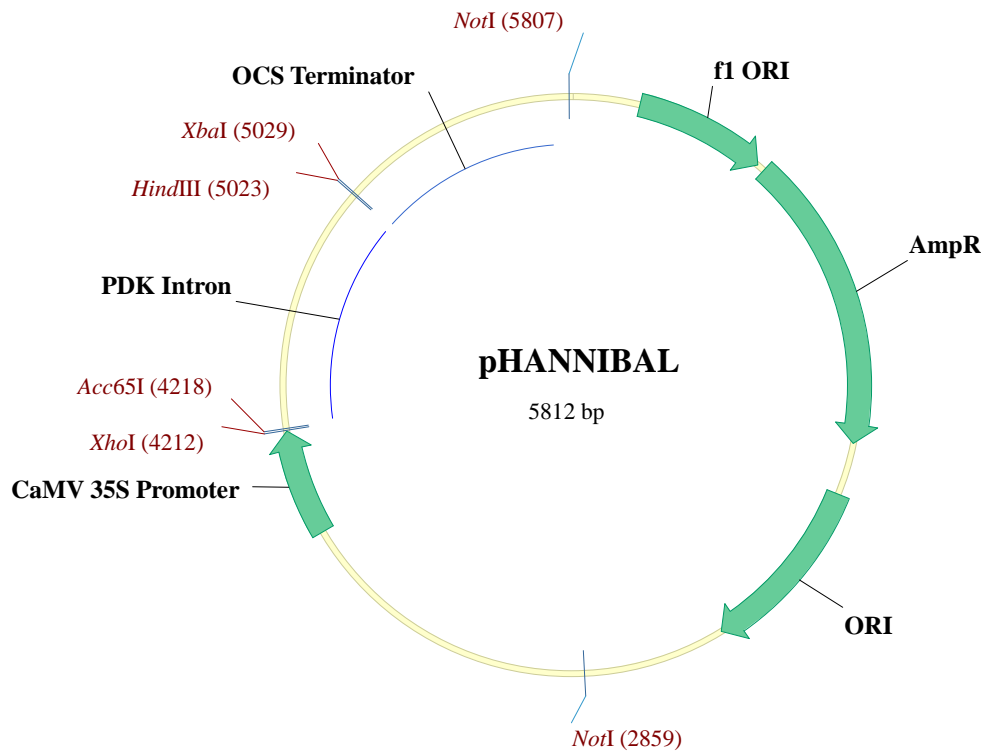


Abbildung 7.5 Plasmidkarte von pHANNIBAL.

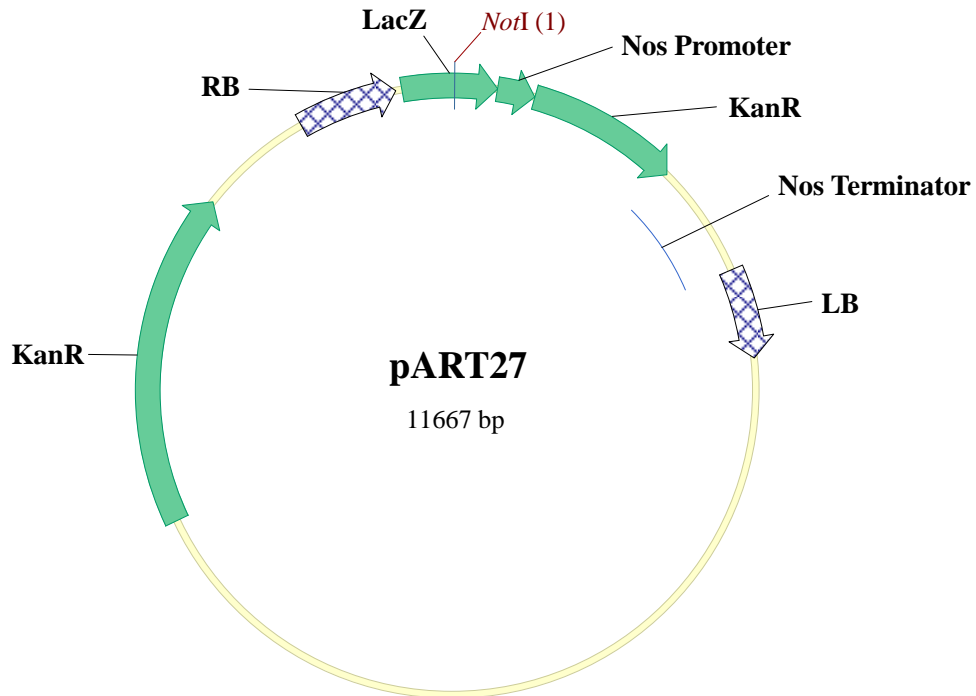


Abbildung 7.6 Plasmidkarte von pART27.

7.2. Alignment und Klassifizierung der VHH-Aminosäuresequenzen

Anhand des Vergleichs der VHH-Aminosäuresequenzen, die mit Hilfe der PE-ELISAs (3.2.2.3) identifiziert wurden, konnte eine Klassifizierung der Nanobodies durchgeführt werden. Somit wurden sechs unterschiedliche VHH-Familien identifiziert. Zur Namensgebung der Nanobodies wurde folgende Nomenklatur angewandt: Bei der Nanobodybezeichnung NbFH-X-Y steht X für die Panningrunde in der die VHH-Sequenz das erste Mal identifiziert wurde, und Y gibt die untersuchte TG1-Einzelkolonie an.

	<-----FR1----->	<-CDR1->	<-----FR2----->	<-CDR2->
NbFH-2-17	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVAS	GRTFDDYN	MGWFRQAPGKEREVAG	ISWNGAAK
NbFH-2-20	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-19	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-23	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-13	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-4	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-7	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-8	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-12	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-3-33	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-3-34	QVQLQESGGGLVHPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYV	MSWYRQAPGKGRELVA	ITSTGDRT
NbFH-2-5	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVAS	GRTFGDYN	MGWFRQAPGKEREVVG	ISWNGAHK
NbFH-3-4	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVAS	GRTFGDYN	MGWFRQAPGKEREVVG	ISWNGAHK
NbFH-2-10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GLAFSLYT	MAWYRQAPGNQRELVA	ISSISTT
NbFH-3-27	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GLAFSLYT	MAWYRQAPGNQRELVA	ISSISTT
NbFH-3-16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GLAFSLYT	MAWYRQAPGNQRELVA	ISSISTT
NbFH-3-1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GLAFSLYT	MAWYRQAPGNQRELVA	ISSISTT
NbFH-2-15	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCVAS	GGTFSGYT	VGWFRQAPGKEREVTF	ITGNSELT
NbFH-3-35	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCVAS	GGTFSGYT	VGWFRQAPGKEREVTF	ITGNSELT
NbFH-3-15	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCVAS	GGTFSGYT	VGWFRQAPGKEREVTF	ITGNSELT
NbFH-3-42	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCVAS	GGTFSGYT	VGWFRQAPGKEREVTF	ITGNSELT
NbFH-3-40	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCVAS	GGTFSGYT	VGWFRQAPGKEREVTF	ITGNSELT
NbFH-3-20	QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSCVAS	GGTFSGYT	VGWFRQAPGKEREVTF	ITGNSELT
NbFH-3-36	QVQLQESGGGLVQLGGSLRLSCAAS	GSILSISV	MAWYRQVSGNQRLVAR	ITDGGNT
	<-----FR3----->	<-CDR3->	<-----FR4----->	
NbFH-2-17	YYVDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPEDTAVYYC	AAEKGTLNYSLVDRPGTYGY	YGGTQVTVSS	
NbFH-2-20	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-2-19	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-2-23	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-2-13	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-2-4	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-2-7	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-2-8	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-2-12	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-3-33	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	
NbFH-3-34	EYAGFVEGRFTISRDNAKEMAYLQMNSLKPEDTTVYYC	YTKASWG-----AGY	WGQGTQVTVSS	

NbFH-2-5	YYVDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPEDTAVYYC	AAEKGT	LNYNLADRPGTYGY	YGQGTQVTVSS
NbFH-3-4	YYVDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPEDTAVYYC	AAEKGT	LNYNLADRPGTYGY	YGQGTQVTVSS
NbFH-2-10	TYTDSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNDLKPEDTAVYYC	NGLAPNYLSA-----	RQY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-27	TYTDSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNDLKPEDTAVYYC	NGLAPNYLSA-----	RQY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-16	TYTDSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNDLKPEDTAVYYC	NGLAPNYLSA-----	RQY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-1	TYTDSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNDLKPEDTAVYYC	NGLAPNYLSA-----	RQY	WGQGTQVTVSS
NbFH-2-15	SYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYC	AAYSRRSTWPTQV--	GDYTY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-35	SYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYC	AAYSRRSTWPTQV--	GDYTY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-15	SYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYC	AAYSRRSTWPTQV--	GDYTY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-42	SYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYC	AAYSRRSTWPTQV--	GDYTY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-40	SYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYC	AAYSRRSTWPTQV--	GDYTY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-20	SYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYC	AAYSRRSTWPTQV--	GDYTY	WGQGTQVTVSS
NbFH-3-36	DYSDSVRGRFTISRDNALNTVYLQMNSLAPEDTAVYYC	YAQQRSS-----	RGY	WGQGTQVTVSS

Abbildung 7.7 Alignment und Klassifizierung der VHH-Aminosäuresequenzen. Ausgehend von den Ergebnissen der beiden PE-ELISAs mit den Einzelkolonien aus der zweiten und dritten Panningrunde wurden 25 VHH-Sequenzen miteinander verglichen. In dieser Abbildung sind die Aminosäuresequenzen der Nanobodies und deren Zuordnung zu einer Familie aufgelistet. Die VHH-Sequenzen einer Familie sind immer untereinander aufgeführt. FR: *Framework region*. CDR: *Complementarity determining region*. Die rosa markierten Cysteine C22 und C94 bzw. C95 bilden untereinander eine Disulfidbrücke aus. Die Darstellung erfolgte nach Kabat *et al.* (1991).

7.3. Alignment der zur Klonierung verwendeten Apyrase-cDNA

Zur Herstellung der dsRNA wurde ein Fragment der Apyrase-cDNA in den pflanzlichen Expressionsvektor pART27 kloniert (3.1.2). Im Folgenden ist das Sequenzierungsergebnis des inserierten cDNA-Fragments in den pCR™-Blunt-Vektor zur Generierung des Plasmids pAPY1441#1 dargestellt. Dazu wurde die Apyrase-cDNA mit der „*Anopheles stephensi* salivary apyrase mRNA, complete cds“-Sequenz (Identifikationsnummer: AY162238.1) verglichen.

```
AY162238.1      1 CAACGATCTGCACGCACGGTTTGATGAAACGAGCCAGAAGTCTTCCGACT  50
|||||
Apyrase-cDNA    1 CAACGATCTGCACGCACGGTTTGATGAAACGAGCCAGAAGTCTTCCGATT  50

AY162238.1     51 GTACCAAGCCGACGGAGTGTATAGCCGGCATAGCGCGCGTGTATCACACG  100
|||||
Apyrase-cDNA    51 GTACCAAGCCGACGGAGTGTATAGCGGGCATAGCGCGCGTGTATCACACG  100

AY162238.1    101 ATCAAGAAGCTAAAGAATGACTATAAATCGAAGAACCCGCTCTACCTCAA  150
|||||
Apyrase-cDNA   101 ATCAAGAAGCTAAAGAATGACTATAAATCGAAGAATCCGCTCTATCTGAA  150

AY162238.1    151 TCGGGGCGATAACTTCCAGGGTACGCTGTGGTACAATCTGCTGCGCTGGA  200
|||||
Apyrase-cDNA   151 TCGGGGCGATAACTTCCAGGGTACGCTGTGGTACAATCTGCTGCGCTGGA  200

AY162238.1    201 ACGTGACGGCACACCTGATTAAGAAGCTGCCACCGGACGTAATGACTCTC  250
|||||
Apyrase-cDNA   201 ACGTGACGGCACACCTGATCAAGAAGCTGCCACCGGACGTAATGACTCTC  250

AY162238.1    251 GGTAACCACGAGTTCGATCACAGCCCGAAAGGGCTTGACACCGTACCTGGC  300
|||||
Apyrase-cDNA   251 GGTAACCACGAGTTCGATCACAGCCCGAAAGGCCTTGACACCGTACCTGGC  300

AY162238.1    301 CGAGCTGGAGGAGATGAAGATCCCGACGGTCGTTGCTAATCTGCAGCTGA  350
|||||
Apyrase-cDNA   301 CGAGCTGGAGGAGATGAAGATCCCGACGGTCGTTGCTAATCTGCAGCTGA  350

AY162238.1    351 ACGGGGAACCGGACCTGCAGGACTCTAAAATCAAGTCTAGCGTTGTGCTA  400
|||||
Apyrase-cDNA   351 ACGGGGAACCGGACCTGCAGGACTCTAAAATCAAGTCTAGCGTTGTGCTA  400

AY162238.1    401 AAGGTTGGCG 410
|||||
Apyrase-cDNA   401 AAGGTTGGCG 410
```

Abbildung 7.8 Alignment des Fragments der Apyrase-cDNA mit der „*Anopheles stephensi* salivary apyrase mRNA, complete cds“-Sequenz (AY162238.1). Beim Alignment wurde das amplifizierte cDNA-Fragment, das zur Klonierung in den pflanzlichen Expressionsvektor pART27 verwendet werden sollte, mit der „*Anopheles stephensi* salivary apyrase mRNA, complete cds“-Sequenz (Identifikationsnummer: AY162238.1) verglichen. Dabei sind übereinstimmende Nukleotide mit einem senkrechten Strich und unterschiedliche Nukleotide mit einem Doppelpunkt gekennzeichnet.

7.4. Rohdaten und Sequenzierungen

Die Rohdaten der experimentellen Ergebnisse, die Sequenzierungen und die originalen Abbildungen befinden sich auf der beigefügten CD-ROM.

Abkürzungsverzeichnis

A ⁺	Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ad	adde (fülle auf)
AP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
ca.	circa
CCP	<i>Complement control protein</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton*
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Fc	<i>Crystallisable fragment</i>
FR	<i>Framework</i>
Gent	Gentamicin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
Glu	Glucose
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HCAb	<i>Heavy-chain antibodies</i>
His-Tag	Polyhistidin-Tag
hpRNA	<i>hairpin RNA</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton* (1 kDa = 1000 Da)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>

miRNA	<i>microRNA</i>
min	Minute
Ni	Nickel
nM	nanomolar
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
ORI	<i>Origin of replication</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline</i> mit Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Rif	Rifampicin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TAE	TRIS-Acetate-EDTA-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMV	Tabakmosaikvirus
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
vgl.	Vergleiche
VE	voll entsalzt
VHH	<i>Variable domain of camelid heavy chain antibody</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

* Einfachheitshalber wird in dieser Arbeit die Einheit Dalton als Synonym für die relative Molekülmasse verwendet.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Verbreitungsgebiet von Malaria.	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des morphologischen Aufbaus von <i>Plasmodium falciparum</i> (Merozoiten).	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Entwicklung von <i>Plasmodium falciparum</i> in menschlichen Erythrozyten.....	7
Abbildung 1.4: Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	8
Abbildung 1.5: Schematische Übersicht über die Pathogenese und das Krankheitsbild einer Malaria tropica.	10
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des RNA-Silencings mittels miRNA und siRNA.	18
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung eines Schwerekettenantikörpers, eines Nanobodies und eines IgG Antikörpers.	24
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der VHH-Sequenz eines Schwerekettenantikörpers.	25
Abbildung 1.9: Mechanismus zum Schutz vor der komplementabhängigen Zytolyse von <i>Plasmodium falciparum</i>	31
Abbildung 2.1: Schematische Übersicht der Assemblierung von den Pro-Vektor-Modulen in <i>Nicotiana benthamiana</i>	72
Abbildung 2.2: Übersicht über die verschiedenen Module des viralen Expressionssystems.	73
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines rekombinanten M13-Phagen.	83
Abbildung 2.4: Schematische Übersicht einer Panningrunde.	84
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Apyrase-cDNA und dem amplifizierten cDNA-Fragment.	94
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des cDNA-Fragments zur Klonierung in pART27.	95
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Klonierung des pflanzlichen Expressionsvektors pAPY7431#7.....	99
Abbildung 3.4: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Geneinbaus in das pflanzliche Genom zur Produktion der hpRNA.	101
Abbildung 3.5: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Detektion der hpRNA auf RNA Ebene.	102
Abbildung 3.6: Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Extraktionen aus Tabakpflanzen.	104
Abbildung 3.7: Darstellung der weiblichen <i>Anopheles</i> -Mücken nach der Nahrungsaufnahme von 10% (w/v) Saccharoselösungen.	105
Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der amplifizierten cDNA-Regionen.	108

Abbildung 3.9: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur qualitativen Überprüfung der generierten Erststränge und der extrahierten RNA aus weiblichen Mückenköpfen.....	109
Abbildung 3.10: Auswertung des Fütterungsexperiments zur posttranskriptionellen Inhibierung des <i>apyrase</i> -Gens mittels quantitativer Real-time-PCR.....	110
Abbildung 3.11: Auswertung des Fütterungsexperiments zur posttranskriptionellen Inhibierung des <i>apyrase</i> -Gens mittels drei quantitativer Real-time-PCRs.....	111
Abbildung 3.12: Schematische Übersicht über die Selektion und Klonierung von VHH-Sequenzen aus einem immunisierten Vertreter der Familie der Camelidae.....	115
Abbildung 3.13: Darstellung der Hybridisierungsorte für die Primer CALL001, CALL002, Primer 38 und Primer A6E.	117
Abbildung 3.14: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate zur Trennung der VHH-cDNA von der VH-cDNA konventioneller IgG1-Antikörper.....	118
Abbildung 3.15: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der Scale-up-PCR zur Amplifizierung der VHH-Sequenzen.	119
Abbildung 3.16: Schematische Darstellung des VHH-pIII-Fusionsproteins zur Verwendung im Panning.	120
Abbildung 3.17: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate des Colony Screenings zur Bestimmung der Transformationseffizienz der Phagen-Bibliothek 1.	121
Abbildung 3.18: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate des Colony Screenings zur Bestimmung der Transformationseffizienz der Phagen-Bibliothek 2.	122
Abbildung 3.19: Anzahl der eluierten Phagen.	124
Abbildung 3.20: SDS-Polyacrylamidgel zur Reinheitsbestimmung der Faktor H-Lösung.	126
Abbildung 3.21: Klassifizierung der Nanobody-Sequenzen.....	130
Abbildung 3.22: Ergebnisse des PE-ELISAs der sechs unterschiedlichen Nanobodies.....	132
Abbildung 3.23: Schematische Darstellung des VHH-Konstrukts zur Produktion von Nanobodies.	133
Abbildung 3.24: SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Produktion von NbFH-2-17-1.....	135
Abbildung 3.25: SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Aufreinigung von NbFH-2-17-1.	136
Abbildung 3.26: SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Umpufferung und Konzentrierung von NbFH-2-17-1.....	137
Abbildung 3.27: SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Produktion und Aufreinigung der sechs unterschiedlichen Nanobodies.	138
Abbildung 3.28: Ergebnisse des ELISAs zum Vergleich der Bindungsaffinitäten der sechs unterschiedlichen Nanobodies zu Faktor H.	139

Abbildung 3.29: Darstellung der Interaktion von NbFH-2-17-1 mit Faktor H.	141
Abbildung 3.30: Darstellung des Bindungsverhaltens von NbFH-2-17-1 mit Faktor H.	142
Abbildung 3.31: Grafische Darstellung der Ergebnisse des ersten Transmission- Blocking- Assays.	145
Abbildung 3.32: Grafische Darstellung der Ergebnisse des zweiten Transmission- Blocking-Assays.	147
Abbildung 3.33: Schematische Darstellung des Konstrukts NbFH-2-17-1-Fc und eines Homodimers.	150
Abbildung 3.34: SDS-Polyacrylamidgel und Western Blot zur Analyse der transienten Produktion von NbFH-2-17-1-Fc in <i>Nicotiana benthamiana</i>	152
Abbildung 3.35: Polyacrylamidgel und Western Blot zur Analyse der Aufreinigung von NbFH-2-17-1-Fc.	155
Abbildung 3.36: Ergebnisse des ELISAs zur Charakterisierung der Bindungsaffinität des NbFH-2-17-1-Fc-Antikörpers zu Faktor H.	157
Abbildung 7.1: Plasmidkarte von pHEN4.	183
Abbildung 7.2: Plasmidkarte von pHEN6(c).	183
Abbildung 7.3: Plasmidkarte von pICH10990.	184
Abbildung 7.4: Plasmidkarte von pCR™-Blunt.	184
Abbildung 7.5: Plasmidkarte von pHANNIBAL.	185
Abbildung 7.6: Plasmidkarte von pART27.	185
Abbildung 7.7: Alignment und Klassifizierung der VHH-Aminosäuresequenzen.	187
Abbildung 7.8: Alignment des Fragments der Apyrase cDNA mit der „ <i>Anopheles stephensi</i> salivary apyrase mRNA, complete cds“ Sequenz (AY162238.1).	188

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion und Kultivierung von transgenen Bakterien und Pflanzen.....	38
Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Primer.	43
Tabelle 2.3: Programm zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der Nanobodies.	69
Tabelle 3.1: <i>In silico</i> Analyse der generierten hpRNA zur Produktion in <i>Nicotiana tabacum</i> und zur Induzierung der RNA-Interferenz in <i>Anopheles stephensi</i>	100
Tabelle 3.2: Auswertung des Fütterungsversuches von weiblichen <i>Anopheles</i> -Mücken.	106
Tabelle 3.3: Übersicht über die Gesamt RNA-Konzentrationen in den applizierten 10% (w/v) Saccharoselösungen.	107
Tabelle 3.4: Gesamtanzahl der weiblichen <i>Anopheles</i> -Mücken während eines Fütterungsexperiments mit hpRNA, WTRNA und Wasser.	107
Tabelle 3.5: Parameter bei der Herstellung der zwei Phagen-Bibliotheken.	120
Tabelle 3.7: Übersicht über die Anreicherung der Phagen, welche in die Kavität mit Faktor H gegeben wurden.....	125
Tabelle 3.8: Übersicht über Quotienten der Absorptionswerte nach der zweiten Panningrunde.	127
Tabelle 3.9: Übersicht über die Quotienten der Absorptionswerte nach der dritten Panningrunde.	128
Tabelle 3.10: Eigenschaften der sechs unterschiedlichen Nanobodies.	134
Tabelle 3.11: Konzentrationen der produzierten und aufgereinigten Nanobodies.	137
Tabelle 3.12: Kinetische Konstanten von der Binding zwischen dem Nanobody NbFH-2-17-1 und Faktor H.	142
Tabelle 3.13: Auswertung des ersten Transmission-Blocking-Assays.	144
Tabelle 3.14: Auswertung des zweiten Transmission-Blocking-Assays.	146

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Warzecha bedanken. Nicht nur für die langjährige Zusammenarbeit, für seine Anregungen, sein Vertrauen in meine Arbeit und die Bereitstellung der wissenschaftlichen Projekte, sondern auch für den zeitlichen Freiraum, den er mir zum Fertigstellen meiner Dissertation gewährt hat.

Auch bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerd Thiel für die Erstellung des wissenschaftlichen Zweitgutachtens.

Weiterhin gilt mein Dank der Bill und Melinda Gates Foundation für die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. Stefan Magez für den Forschungsaufenthalt an der Vrije Universiteit Brussel und bei Dr. Sandip Kamath und Dr. Feyi Obishakin für die Zusammenarbeit bei der Ausführung des Phagen-Displays. Auch bedanke ich mich bei der European Cooperation in Science and Technology (COST) für die finanzielle Ermöglichung der Short-Term Scientific Mission (STSM). Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar und bei Herrn Dr. Stefan Zielonka für die wissenschaftliche Kooperation bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Pradel und besonders Herrn Dr. Matthias Scheuermayer für die Ausführung der *in vivo* Fütterungsversuche am Institut für Molekulare Infektionsbiologie an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.

Ein großes Dankeschön gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Warzecha für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den außeruniversitären Unternehmungen und der gemeinsam verbrachten, schönen Zeit. Auch möchte ich mich bei Dr. Agata Staniek für die Kurzurlaube im botanischen Garten und bei Sabine Fräbel für ihre zahlreichen Ideen für Arbeitsgruppenausflüge bedanken. Vielen Dank auch an die vielen Diplomanten, Bachelor- und Masterstudenten, die mich während meiner Promotionszeit begleitet haben. Außerdem bedanke ich mich bei den Gärtnern und Gärtnerinnen für die freundliche Zusammenarbeit und die Versorgung der Tabakpflanzen und bei Sven Bühring für die vielen Reparaturen in unserem Labor. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Sören Boller, Arne Seehaus, Dr. Steven Bump, Jenny Brettschneider, Dr. Henrik Sperling, Ralf Jagelle und Marc Jakuszeit für den regen wissenschaftlichen Austausch und für die inspirierenden Gespräche bedanken.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Eltern und Madlen, die mich während meiner Promotionszeit und darüber hinaus immer uneingeschränkt und liebevoll unterstützt haben und ein wichtiger Bestandteil in meinem Leben sind. Auch möchte ich mich bei Dr. Heiner Pennekamp für seine hilfsbereite Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Henning Pennekamp

Geburtsdatum: 02.09.1982

Geburtsort: Kiel

Promotionsstudium und Hochschulstudium

- | | |
|--------------------------|---|
| 10/2010 – heute | Promotionsstudium an der Technischen Universität Darmstadt
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Warzecha:
Plant Biotechnology and Metabolic Engineering |
| 10/2003 – 09/2010 | Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Lipidmodifikation rekombinanter Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i> .“
Abschluss: Diplom-Biologe |

Vortrag und Forschungsaufenthalt

- | | |
|----------------|---|
| 05/2013 | Pennekamp, H.; Magez, S.; Pradel, G.; Warzecha, H. “Generation of Nanobodies for Plant-Made Measures Against Malaria.” Final COST Meeting Molecular Farming, 5.5-8.5.2013, Valencia, Spanien. |
| 05/2012 | Vrije Universiteit Brussel, Belgien; 11.5. - 4.6.2012
European Cooperation in Science and Technology (COST)
Projekt: Generating antimalarial Nanobodies
Gastprofessor: Prof. Dr. Stefan Magez |

Zivildienst

- | | |
|--------------------------|--------------------------------|
| 07/2002 – 04/2003 | Umweltschutzamt in Kiel |
|--------------------------|--------------------------------|

Schulische Ausbildung

- | | |
|--------------------------|--|
| 09/1992 – 07/2002 | Gymnasium Wellingdorf in Kiel
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife |
|--------------------------|--|

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 21.10.2015

Henning Pennekamp